

А.Б.Рубин

БИОФИЗИКА







А.Б.Рубин

БИОФИЗИКА

В двух книгах

Книга 2

Биофизика клеточных процессов

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебника для студентов биологических специальностей высших учебных заведений



МОСКВА «ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1987

ББК 28.071
Р 82
УДК 577.3

Рецензенты:
кафедра биофизики Воронежского государственного университета
имени Ленинского комсомола
(зав. кафедрой — д-р биол. наук В. Г. Артюхов);
чл.-кор. АН СССР, проф. М. В. Волькенштейн
(Институт молекулярной биологии АН СССР)

Рубин А. Б.
Р 82 Биофизика: В 2-х кн.: Учеб. для биол. спец. вузов.
Кн. 2. Биофизика клеточных процессов. — М.: Высш.
шк., 1987.—303 с.: ил.

Во второй книге (главы XV—XXX) учебника «Биофизика» рассмотрены механизмы процессов, реально протекающих в организмах. Детально разобраны вопросы структуры и функционирования биологических мембран и механизмы проницаемости, биоэлектрогенеза, процессов возбуждения и мышечного сокращения, рецепции, переноса электронов и трансформации энергии в биомембранах. Раскрыта природа первичных стадий различных фотобиологических процессов, в том числе фотосинтеза и фотохимических реакций в биополимерах.

Р 2001040000(4309000000)—390
001(01)—87 160—87

ББК 28.071
57.04

Предисловие

В основу учебника положена программа общего курса биофизики для студентов биологических факультетов государственных университетов. Широкое развитие биофизики и проникновение ее в различные смежные области биологии и медицины стало возможным главным образом благодаря формированию в биофизике собственной теоретической базы. Именно на этой единой основе читаются общие курсы биофизики в различных биологических, медицинских, физических и сельскохозяйственных вузах.

Настоящий учебник ориентирован главным образом на подготовку специалистов-биологов экспериментального профиля. Поэтому основное внимание уделяется результатам, полученным биофизикой в решении соответствующих биологических проблем. Однако изложение общих теоретических положений носит достаточно универсальный характер и может быть полезно широкому кругу различных специалистов.

В учебнике при изложении основ биофизики использованы необходимые сведения из общих курсов смежных биологических дисциплин и общих курсов физики, химии, физической химии и математического анализа для студентов-биологов. Кроме того, введены и разъяснены некоторые физико-математические понятия, которые применяются в современной биофизике, но не входят в программы университетских дисциплин физико-математического цикла при подготовке студентов биологических специальностей.

Учебник состоит из двух книг. В первой — изложены теоретические положения кинетики и термодинамики биологических процессов и основы молекулярной биофизики; проанализированы физические модели и представления, лежащие в основе понимания молекулярно-кинетических механизмов биологических процессов.

Изложенный материал служит в биофизике теоретической базой для анализа биологических явлений на разных уровнях организации при выяснении элементарных молекулярных взаимодействий и путей регуляции в биологических системах. Как было показано выше, этот подход связан с современной идеей об электронно-конформационных взаимодействиях в макромолекулярных комплексах, функциональные свойства которых определяют как молекулярные особенности метаболических процессов, так и конкретные механизмы их регуляции.

Биофизика внесла достойный вклад в исследование ряда процессов в клетке, где удалось понять особенности биологических явлений путем раскрытия их молекулярных механизмов.

Во второй книге рассмотрены основы биофизики клеточных процессов. В ней представлены данные о структурно-функциональной организации биологических мембран: описаны молекулярная организация и конформационные свойства биологических мембран. Специальный раздел учебника посвящен биофизике процессов транспорта веществ через биомембраны и биоэлектро-

генезу; он содержит данные о транспорте неэлектролитов, ионных равновесиях, ионном транспорте в каналах и индуцированном ионном транспорте. Рассмотрена электродиффузионная теория транспорта ионов через мембраны, активный транспорт и транспорт ионов в возбудимых мембранах.

В книге изложены представления о переносе электронов и трансформации энергии в биомембранах, биофизике сократительных систем и процессах рецепции. Подробно представлен материал о биофизике фотобиологических процессов. Описаны первичные процессы фотосинтеза и другие биологические процессы в биологических системах: трансформация энергии и электронно-конформационные взаимодействия в первичных процессах фотосинтеза; фотохимические реакции бактериородопсина и родопсина; фоторегуляторные и фотодеструктивные процессы.

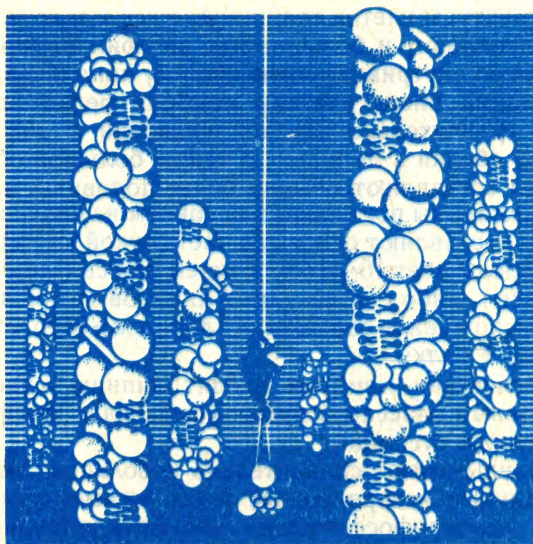
В заключении показаны основные пути дальнейшего развития биофизики и использования ее достижений для решения практических задач.

Автор

Часть третья
Биофизика
мембранных процессов

VI

**Структурно-функциональная
организация
биологических мембран**



XV

**Молекулярная организация
биологических мембран**

XVI

Конформационные свойства мембран

Глава XV

Молекулярная организация биологических мембран



§ 1. Состав и строение биологических мембран

Биологическими мембранами (от лат. *membrana* — перепонка) называют функциональные структуры клеток толщиной в несколько молекулярных слоев, ограничивающие цитоплазму и большинство внутриклеточных структур, а также образующие единую внутриклеточную систему канальцев, складок и замкнутых полостей. Толщина биологических мембран редко превышает 10,0 нм, однако вследствие сравнительно плотной упаковки в них основных молекулярных компонентов (белки и липиды), а также большой общей площади клеточных мембран они составляют обычно более половины массы сухих клеток.

Биологические мембраны построены в основном из белков, липидов и углеводов. Белки и липиды составляют основную часть сухой массы мембран. Доля углеводов обычно не превышает 10—15%, причем они связаны либо с молекулами белка (гликопротеины), либо с молекулами липидов (гликолипиды). В мембранах различного происхождения содержание липидов колеблется от 25 до 75% по массе по отношению к белку.

В состав биологических мембран входят липиды, относящиеся главным образом к трем основным классам: глицерофосфатиды (фосфолипиды), сфинго- и гликолипиды, а также стероиды.

Мембранные липиды имеют сравнительно небольшую полярную (заряженную) головку и длинные незаряженные (неполярные) углеводородные цепи. Полярные головки глицерофосфатидов — фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин — несут положительный и отрицательный заряд и при нейтральных pH в целом электронейтральны (цвиттерийонные липиды). Фосфатидилсерин и фосфатидилинозит имеют по одному, а кардиолипин — два некомпенсированных отрицательных заряда.

Жирные кислоты, входящие в состав липидов биологических мембран, обычно имеют от 14 до 22 углеродных атомов. Углеводородные цепи могут быть полностью насыщенными либо содержать 1—6 ненасыщенных двойных связей. Двойные связи практически всех жирных кислот находятся в цис-конформации. В природных фосфолипиде жирные кислоты, имеющие ненасыщенные связи, обнаруживаются, как правило, во 2-м положении глицеринового остатка. Многочисленные экспериментальные данные указывают, что в природных мембранах липидный состав внутреннего и наружного слоев может различаться по качественному и жирнокислотному составу.

Белковый состав мембран также исключительно многообразен. Большинство мембран, за редким исключением, содержит большое число различных белков, молекулярная масса которых колеблется от 10 000 до 240 000.

В зависимости от степени гидрофобности, числа и локализации гидрофобных

Таблица XV.1. Липидный состав мембран клеток млекопитающих, % от массы всех липидов (по Д. Робинсону, 1968)

Липиды	Плазматические мембраны	Митохондрии	Лизосомы	Ядра	Эндоплазматический ретикулум	Аппарат Гольджи
Фосфатидилхолин	18,5	37,5	23,0	44,0	48,0	24,5
Сфингомиелин	12,0	0	23,0	3,0	5,0	6,5
Фосфатидилэтаноламин	11,5	28,5	12,5	16,5	19,0	9,0
Фосфатидилсерин	7,0	0	6,0	3,5	4,0	2,5
Фосфатидилинозитол	3,0	2,5	6,0	6,0	7,5	5,0
Лизофосфатидилхолин	2,5	0	0	1,0	1,5	3,0
Дифосфатидилглицерин	0	14,0	5,0	1,0	0	0
Другие фосфолипиды	2,5	—	—	—	—	—
Холестерин	19,5	—	14,0	10,0	5,5	7,5
Эфиры холестерина	2,5	2,5	8,0	1,0	1,0	4,5
Свободные жирные кислоты	6,0	—	—	9,0	3,5	18,0
Другие липиды	15,0	15,0	2,5	5,5	5,0	16,0

аминокислотных остатков в полипептидной цепи белки либо частично, либо целиком погружены в липидный слой мембран или пронизывают его насквозь. Наиболее слабо связаны с мембраной так называемые периферические белки, которые удерживаются в мембране за счет слабых, в основном неэлектростатических, взаимодействий. Белки, сильно связанные с липидами мембран и глубоко погруженные в липидный слой мембран, так называемые интегральные белки, составляют основную массу мембранных белков. Обычно полипептидные цепи этих белков включают большое число неполярных аминокислотных остатков.

В функциональном отношении мембранные белки подразделяются на ферментативные, транспортные и регуляторные. Выделяют также структурные белки, которые выполняют в основном «опорно-строительные» функции.

Важным структурным компонентом мембран является вода (см. § 4 гл. IX). Особенности взаимодействия основных молекулярных компонентов мембран с водой определяют не только многие структурно-функциональные свойства мембран, но и являясь решающими в процессе формирования самих мембран и стабилизации мембранных систем. Воду, входящую в состав мембран, подразделяют на связанную, свободную и захваченную. Наименьшей подвижностью отличается так называемая внутренняя связанная вода, присутствующая в виде одиночных молекул в углеводородной зоне мембран. Эта фракция воды, по данным ЯМР-спектроскопии, характеризуется временем корреляции $\tau_c \sim 10^{-7}$ с. Основная часть связанной воды — вода гидратных оболочек. Подвижность этой воды в мембранах выше, что приводит к меньшим значениям: $\tau_c \leq (8 \div 10) \cdot 10^{-10}$ с. Гидратные оболочки образуются главным образом вокруг полярных частей молекул липидов и белков. Гидратные оболочки основных структурообразующих липидов состоят обычно из 10—12 молекул воды. Эта вода осмотически неактивна, она не способна растворять какие-либо вещества.

Слабосвязанная вода по подвижности и некоторым другим свойствам занимает промежуточное положение между водой гидратных оболочек и жидкой свободной водой.

Свободная вода входит в состав мембран в виде самостоятельной фазы и обладает изотропным движением, характерным для жидкой воды. Захваченная вода, обнаруживаемая иногда в центральной части мембран между липидными бислоями, по параметрам подвижности соответствует жидкой свободной воде, но медленно обменивается с внешней водой из-за физической разобщенности.

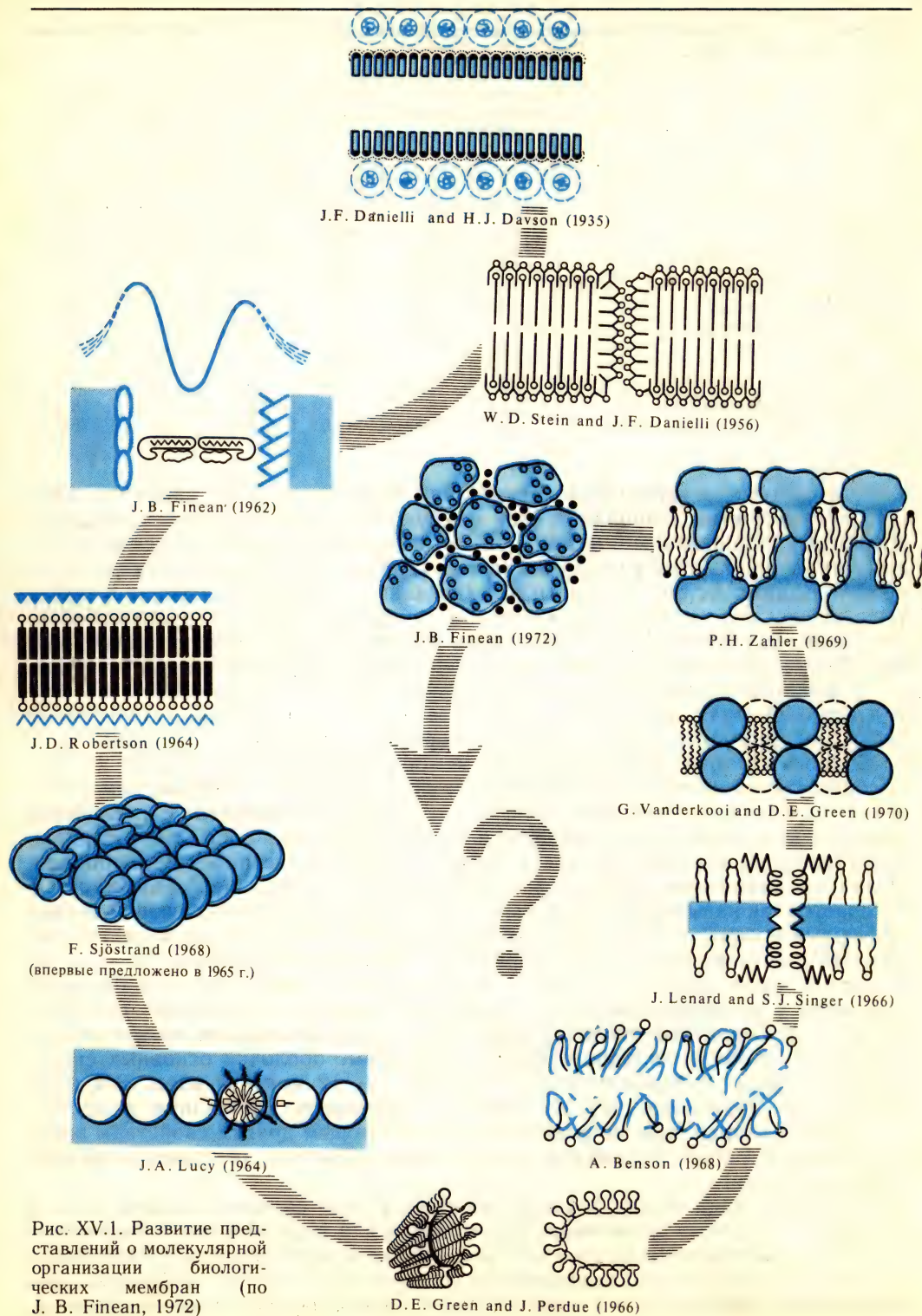


Рис. XV.1. Развитие представлений о молекулярной организации биологических мембран (по J. B. Finean, 1972)

Изучение строения мембран необходимо для понимания их функционирования. В 1935 г. Ф. Даниэлли и Г. Давсон выдвинули первую гипотезу о строении биологических мембран, согласно которой мембрана состоит из двойного липидного слоя, покрытого с двух сторон слоями глобулярных белков.

В 50-х годах XX в. методом электронной микроскопии были получены снимки мембран в виде трехслойных структур толщиной около 10 нм для плазматических и несколько меньшей — для субклеточных мембран. В 1964 г. Дж. Робертсон предложил унитарную схему асимметричного строения мембраны. В соответствии с этой схемой белки могут разворачиваться на поверхности двойного липидного слоя под действием сил электростатического взаимодействия с заряженными головками фосфолипидов мембран; на наружной поверхности мембраны располагаются еще и молекулы гликопротеинов. Однако под влиянием новых фактов, и в первую очередь обнаружения зернистой структуры мембран, которая просматривалась на снимках, полученных при большом увеличении, первоначальные представления о трехслойности мембран были пересмотрены. На рис. XV.1 отражены изменения представлений о строении мембран.

В настоящее время считают, что белки не выстилают поверхность липидного слоя мембран, а «плавают» на поверхности в виде отдельных глобулярных молекул или частиц, в большей или меньшей степени погруженных в мембрану. Эта жидкомозаичная модель, предложенная Дж. Ленардом и С. Сингером (1966), позволяет удовлетворительно объяснить целый ряд фактов, в частности зависимость многих физиологических функций мембран и активности отдельных мембранных ферментов от фазового состояния липидов в мембране, ее текучести (вязкости). Более поздняя белково-кристаллическая модель (G. Vanderkooi, D. Green, 1970) отличается от жидкомозаичной модели фактически лишь постулированием существования в мембране жесткой белковой структуры, возникающей в результате дальнедействующих белок-белковых связей.

В настоящее время получили наибольшее распространение различные варианты жидкомозаичной модели.

§ 2. Образование мембранных структур

Монослой. Жидкие кристаллы

Основные мембранообразующие липиды представляют собой соединения с идеальным сочетанием гидрофобных и гидрофильных свойств. Они сравнительно плохо растворимы в воде в мономерном виде, а стремление их полярных головок максимально контактировать с водой придает им уникальные способности образовывать многообразные сравнительно устойчивые структуры при агрегации этих молекул.

Нерастворимые монослой на границе раздела вода — воздух. Большинство мембранообразующих липидов при нанесении их на поверхность воды практически не растворяется в объемной фазе, а быстро растекается по поверхности, образуя мономолекулярный слой (И. Ленгмюр, 1933). При сжатии монослоя начинают проявляться межмолекулярные взаимодействия, нарушающие состояние идеального двумерного газа (рис. XV.2, А).

Дальнейшее возрастание давления приводит к формированию так называемой растянутой жидкой пленки. Молекулы в этом состоянии обладают всеми степенями свободы, как и в обычной жидкости, однако их полярные головки фиксированы на поверхности раздела фаз (рис. XV.2, В). Углеводородные цепи молекул в этом состоянии склонны к агрегации и взаимопроникновению.

При дальнейшем возрастании давления в монослой будет реализовываться

наиболее плотная упаковка молекул, т. е. их вертикальная ориентация. Вначале подвижность углеводородных цепей будет выше, чем у полярных головок, так как последние сильно гидратированы. В этом состоянии сохраняется возможность движения молекул в плоскости поверхности (латеральная подвижность) и его можно рассматривать как конденсированную жидкую пленку (рис. XV.2, C). Дальнейшее уплотнение слоя при возрастании давления может произойти лишь за счет разрушения гидратных оболочек полярных головок, после чего слой становится практически несжимаемым и находится в твердоконденсированном состоянии (рис. XV.2, D), где площадь поперечного сечения молекул не зависит от длины углеводородной цепи. Площадь поперечного сечения

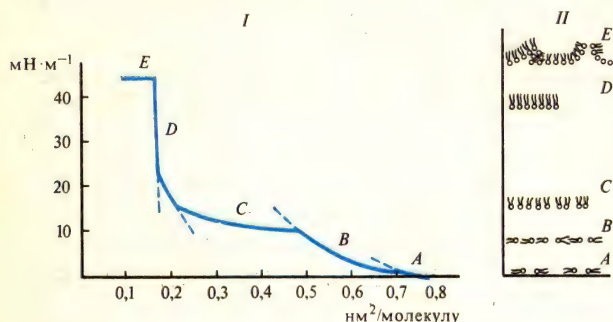


Рис. XV.2. Кривая (изотерма) площадь — давление для монослоя длинноцепочечных липидов (I) и схема расположения липидных молекул на границе раздела фаз вода — воздух (II): А—состояние двумерного газа, В—растянутая жидкая пленка, С—конденсированная жидкая пленка, D—твердоконденсированное состояние, Е—состояние коллапса

углеводородной цепи составляет $\sim 0,2 \text{ nm}^2$, предельная площадь молекул насыщенного фосфатидилхолина — $0,44$, а фосфатидилэтаноламина $\sim 0,4 \text{ nm}^2$. После превышения некоторого предельного давления монослой начинает разрушаться — состояние коллапса (рис. XV.2, E).

Поверхностные монослои широко используют в качестве модельных мембранных систем. С их помощью изучают подвижность и типы упаковки молекулярных компонентов в мембранах, межмолекулярные взаимодействия в мембранах, механические свойства мембран; исследуют кинетику и механизмы ферментативных процессов, протекающих на границе раздела фаз; изучают процессы переноса ионов и электронов через границу раздела фаз, инжекцию заряда в липидный слой (диэлектрик) и т. д. Однако этот метод имеет ряд ограничений, в значительной степени обусловленных тем, что монослой — это лишь половина липидного слоя мембран, обращенного в газовую фазу. Последнего ограничения удастся избежать при использовании в качестве мембраны мономолекулярного слоя, образующегося на границе двух несмешивающихся жидкостей (углеводород — вода). Более адекватные модели, представляющие собой липидные бислои, удастся получить в виде полимолекулярных структур, которые образуются липидами в объеме водной фазы.

Лиотропный и термотропный полиморфизм липидов. Как было показано, полярные части мембранообразующих липидов сильно взаимодействуют с водой, поэтому эти соединения могут смешиваться с водой в любых соотношениях. Однако возникающие смеси не представляют собой истинных растворов, а образуют многообразные упорядоченные фазы с периодической структурой. В зависимости от количества присутствующей в системе воды эти фазы закономерно (для конкретных липидов) переходят друг в друга (рис. XV.3; лиотропный полиморфизм). Изменение структурной организации системы липид —

вода в зависимости от температуры получило название термотропного полиморфизма.

Устойчивость того или иного типа мезофаз и диапазон их существования определяются гидрофобным эффектом, а также эффективной геометрической формой липидных молекул.

Наличие нескомпенсированного заряда на полярной головке молекул липида, например фосфатидилсерина, затрудняет формирование плоских структур этими молекулами вследствие эффекта электростатического отталкивания. Такие молекулы проявляют повышенную склонность образовывать радиально ориентированные структуры с большой кривизной поверхности.

Рис. XV.3. Бинарная фазовая диаграмма смеси яичного фосфатидилхолина с водой как функция температуры (по В. Ф. Антонову, 1982):

I — жидкокристаллическое состояние липида, ламеллярный бислой; II — двухфазная система вода — жидкие кристаллы, ламеллярный бислой; III — область, где жидкокристаллические ламеллярные бислойные структуры сосуществуют с гексагональными; IV — твердая (гелеобразная) ламеллярная фаза; T_n — кривая температуры фазового перехода

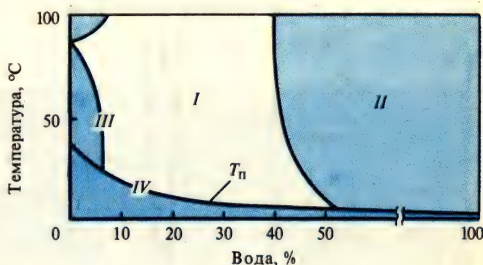
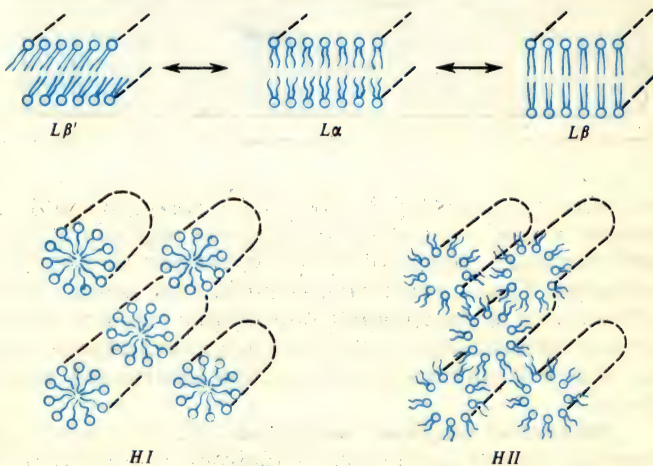


Рис. XV.4. Строение (поперечный разрез) мезофаз: L — ламеллярная фаза; α — жидкоподобная фаза, β и β' — кристаллические фазы с различным углом наклона цепей к поверхности раздела фаз, HI — гексагональная; HII — инвертированная гексагональная (вода в липиде)



Ламеллярный тип организации бислойных структур наиболее соответствует характеру молекулярной организации липидов в биологических мембранах

Сложные протяженные и чередующиеся структуры характеризуются анизотропией механических, электрических, магнитных и оптических свойств. Эти структуры обладают промежуточными свойствами между жидкостями и твердыми кристаллами и представляют собой типичные жидкокристаллические (мезоморфные) состояния липидов.

Из всего разнообразия зарегистрированных мезофаз, с биологической точки зрения, наиболее интересны однопространственная ламеллярная и двухпространственная цилиндрическая, или гексагональная (рис. XV.4).

Повышенный интерес к небислойным, в частности гексагональным (или мицеллярным), структурам обусловлен способностью этих структур формировать сквозные поры, резко увеличивающие проницаемость мембран для воды и растворенных веществ.

Искусственные бислойные мембраны

Мультиламеллярные липосомы. Плоские ламеллярные структуры проявляют склонность (при энергичном встряхивании) образовывать замкнутые сферические частицы. Этот процесс энергетически выгоден, так как в этом случае достигается минимум площади контакта гидрофобных поверхностей с водой. При простых механических воздействиях образуются в основном многослойные

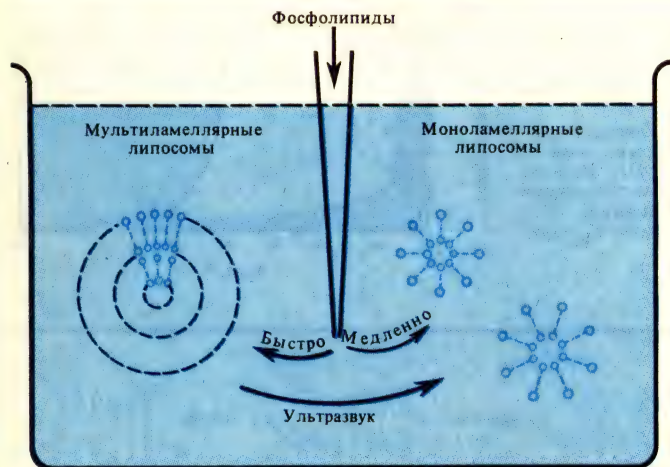


Рис. XV.5. Образование замкнутых фосфолипидных везикул (липосомы).

частицы (диаметром в несколько микрометров) с концентрической организацией слоев — мультиламеллярные липосомы или везикулы (мешочки). В этих частицах липидные бислои отделяют внутреннюю водную фазу от внешнего раствора. Такая организация позволяет использовать мультиламеллярные липосомы для исследования барьерных свойств липидного бислоя и некоторых других специальных задач. Мультиламеллярные липосомы осмотически активны: они изменяются в объеме при изменении осмотических свойств внешней среды.

Моноламеллярные липосомы. Более энергичное воздействие на грубые фосфолипидные дисперсии, например с помощью ультразвукового излучения, вызывает образование моноламеллярных (однослойных) везикул (диаметр 20,0—40,0 нм). В зависимости от эффективной конфигурации липидных молекул (критический параметр упаковки и заряд) размеры моноламеллярных липосом могут несколько варьировать (рис. XV.5; табл. XV.2).

Моноламеллярные липосомы широко и эффективно используют в разнообразных исследованиях биологического и медико-биологического характера. Тем не менее малый внутренний объем и осмотическая неактивность липосом существенно сужают круг этих исследований. В последнее время разработаны методики получения больших (100 нм в диаметре и более) моноламеллярных липосом, которые лишены этих недостатков.

Протеолипосомы. Многие мембранные белки и мелкие фрагменты биологических мембран сравнительно легко могут быть включены в состав искусственных везикулярных мембран. Такие комбинированные системы называются протеолипосомами. Эффективность встраивания большинства белковых компонентов в искусственные мембранные системы резко зависит от липидного состава мембран, pH, солевого состава, температуры и т. д. Как правило, эффективность встраивания белковых молекул или липопротеиновых фрагментов в мембраны возрастает в присутствии небольших количеств детергентов. Полагают, что сравнительно мелкие молекулы детергентов заполняют дефекты на границе белковой молекулы в мембране, экранируя гидрофобные участки мембраны от воды.

Исключительная ценность протеолипосом как искусственных мембранных систем в первую очередь определяется широкими возможностями, которые

Таблица XV. 2. Параметры мембран моноламеллярных липосом из яичного фосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилхолина (бислой в «жидком» состоянии)

Параметр	Яичный лецитин	Дипальмитоиллецитин
Радиусы (r_v , r_c , r_n), нм ¹	6,2; 7,8; 9,9; 3,7	7,4; 8,9; 10,9; 3,5
Толщина наружного монослоя ($r_c - r_v$), нм	2,1	1,98
Толщина внутреннего монослоя ($r_c - r_n$), нм	1,6	1,52
Число молекул n_n	1658	1970
Число молекул n_v	790	1030
n_n/n_v	2,1	1,9
Объем на молекулу липида, нм ³	1,25	1,20
Поверхностная площадь на молекулу, нм ² :		
в наружном монослое	0,74	0,76
во внутреннем монослое	0,61	0,69

¹ Индексы «н», «в» и «с» обозначают наружный, внутренний монослой и середину углеводородной зоны мембран соответственно.

эти системы предоставляют для исследования функционирования многих важных компонентов биологических мембран. По существу, получение протеолипосом можно рассматривать как последний этап перед полной реконструкцией функционирующих мембранных систем из составляющих их компонентов.

Следует отметить, что способность образовывать замкнутые везикулярные частицы свойственна не только искусственным липидным системам. Она широко проявляется при различных способах фрагментации биологических мембран (ультразвук, детергенты, механическое диспергирование и пр.). Замкнутые мембранные пузырьки образуют фрагменты мембран саркоплазматического и эндоплазматического ретикулаума, внутренней мембраны митохондрий. В некоторых случаях удается получить везикулы с вывернутой ориентацией мембран, что чрезвычайно важно для изучения структурно-функциональной организации этих мембран.

Плоские бислойные липидные мембраны. Липиды, спонтанно образующие ламеллярные слои, обычно способны формировать бислойные структуры (БЛМ или «черные» пленки) на небольших отверстиях в тонких гидрофобных материалах. Это явление впервые было описано О. Мюллером и соавторами (1962), которые получили БЛМ из фосфолипидов мозга на небольших отверстиях (0,5—5,0 мм²) в тефлоновой перегородке, разделяющей две водные фазы. Доказав бислойность сформированных мембран, авторы с помощью простой электроиз-

мерительной техники охарактеризовали важнейшие электрические параметры этих мембран. Относительная простота получения БЛМ, широкий спектр применения разнообразных электроизмерительных методов исследования, возможность изменять в широких пределах липидный состав БЛМ и состав омывающих растворов, включать в БЛМ разнообразные модификаторы барьерных свойств мембран, функционально активные элементы биологических мембран — все это быстро обеспечило этим искусственным мембранным системам центральное место в современной экспериментальной мембранологии.

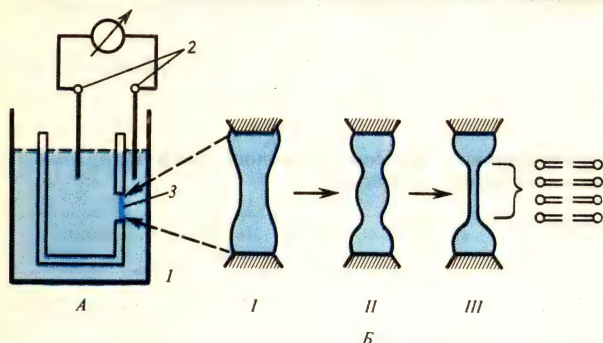


Рис. XV.6. Образование бислойной липидной мембраны (БЛМ). А — ячейка для получения БЛМ и изучения ее электрических свойств; Б — этапы формирования БЛМ (I — толстая мембрана, II — выпуклая линзоподобная мембрана, III — БЛМ): 1 — тефлоновый стакан, 2 — электроды, 3 — круглое отверстие в стенке тефлонового стакана

Общая схема ячейки для формирования БЛМ и несколько последовательных этапов формирования бислойной структуры приведены на рис. XV.6. Процесс образования БЛМ начинается с нанесения небольшого количества подходящего липида, растворенного обычно в жидких углеводородах (гексан, октан, декан и др.), на отверстие в тефлоновом стаканчике (рис. XV.6, I). Далее эта толстая пленка самопроизвольно утоньшается вплоть до образования бислойной структуры (рис. XV.6, III).

Главными силами, определяющими поведение пленки, являются межфазное (поверхностное) натяжение (σ) и ван-дер-ваальсовы силы притяжения водных фаз по обе стороны пленки, сжимающие пленку в поперечном направлении, — расклинивающее давление (см. XV.3.6 и XV.3.8).

Первоначально толщина липидной пленки превышает 100 нм. При такой толщине расклинивающее давление близко к нулю и поведение липидной массы определяется различием гидростатического давления в ее периферической искривленной части — торе — и центральной сравнительно плоской части. В соответствии с законом Лапласа различие гидродинамического давления Δp между фазой, находящейся под вогнутой поверхностью раздела (в торе), и фазой над этой поверхностью определяется выражением

$$\Delta p = \sigma (1/R_1 + 1/R_2),$$

где R_1 и R_2 — внутренний и наружный радиусы кривизны поверхности.

Очевидно, что в центральной части пленки, где радиус кривизны близок к бесконечности ($R_1 = R_2 \rightarrow \infty$), $\Delta p = 0$. Это означает, что в торе гидродинамическое давление ниже, чем в плоской части мембраны, и вследствие этого жидкая мембранообразующая фаза будет выдавливаться из центральной части в радиальном направлении. Скорость этого потока будет максимальной на периферии пленки в областях, прилегающих к тору, где линейный градиент гидродинамического давления максимален. В соответствии с этим плоская часть пленки быстрее утоньшается по периферии, формируя линзообразную структуру (см. рис. XV.6, II).

В участках, где толщина пленки становится тоньше ~ 100 нм, вмешиваются силы взаимодействия поверхностных слоев и водных фаз по обе стороны пленки. Совокупность этих сил либо ускоряет процесс утоньшения пленки — отрицательное расклинивающее давление, либо препятствует этому процессу — положительное расклинивающее давление. Дальнейшее утоньшение пленки приводит или к ее разрыву, или к скачкообразному формированию устойчивой, чаще всего бислойной, структуры. Формирование бислойной структуры заканчивается, когда она распространится на всю площадь, непосредственно кон-

Таблица XV. 3. Сравнение свойств искусственных липидных и биологических мембран

Свойство	Биомембраны	Бислойные липидные мембраны
Электронно-микроскопический снимок поперечного среза	Трехслойная структура	Трехслойная структура
Толщина, нм	6,0—10,0	2,5—8,0
Межфазное натяжение, Н/см	$(0,03—3,0) \times 10^{-5}$	0,2—6,0
Сопротивление, Ом/см ²	$10^2—10^5$	$10^6—10^9$
Электрическая емкость, мкФ/см ²	0,5—1,3	0,2—1,0
Напряжение пробоя, мВ	100	150—300
Показатель преломления	1,6	1,56—1,66
Проницаемость для воды, мкм/с	0,5—400	31,7
Энергия активации водной проницаемости, кДж/моль	40,3	53,3
Ионная избирательность P_K/P_{Na+}	1—25	5,4—9,0

тактируя с тором. Обычно формирование бислойной структуры протекает в течение 5—20 мин, однако продолжительность этого процесса резко зависит от многих параметров (липидный состав, температура, pH, ионная сила и состав растворов и другие, часто неконтролируемые, параметры).

Процесс утоньшения пленки и формирования БЛМ можно наблюдать визуально в отраженном свете. Пока пленка толстая, она выглядит как обычное макротело. Когда толщина пленки становится соизмеримой с длиной волны падающего света, начинает проявляться интерференция лучей, отраженных от передней и задней поверхности пленки; на поверхности мембраны возникают цветные узоры, известные в оптике под названием колец Ньютона. Такие небислойные пленки, содержащие линзоподобные утолщения, получили название цветных пленок. Бислойные липидные структуры в отраженном свете выглядят черными на светлом фоне, в связи с чем и называются «черными». Низкая отражающая способность таких пленок обусловлена тем, что разность фаз между лучами, отраженными от передней и задней поверхностей пленки, близка к π , т. е. эти лучи находятся в противофазе и гасят друг друга.

Формирование черной бислойной мембраны не означает полного завершения всех процессов формирования БЛМ. Параллельно с почернением идут более медленные и продолжительные процессы: растекание липидного раствора по поверхности перегородки, на которой сформирована мембрана, выход растворителя из мембраны в объем тора и водную фазу, а также уплотнение упаковки молекул липида в монослой и на поверхности тора. Все эти процессы приводят к постепенному (в течение 10—20 мин после почернения) снижению поверхностного натяжения и увеличению электрической емкости БЛМ вплоть до некоторых стационарных значений.

В целом по своим электрическим характеристикам и ряду других физико-химических свойств бислойные липидные пленки, приготовленные из природных липидов, близки к биологическим мембранам (табл. XV.3). Немодифицированные искусственные БЛМ отличаются низкой проводимостью. Они лишены

метаболической активности и не обладают столь высокой селективностью, как биологические мембраны. Однако многие из этих свойств могут быть приданы искусственным мембранам путем введения в их состав разнообразных мембранно-активных соединений и отдельных функционально важных элементов биологических мембран. В присутствии всех этих модификаторов проводимость бислоевых мембран обычно возрастает. Все это свидетельствует, что бислоевая липидная структура выполняет роль естественной матрицы для многих молекулярных компонентов биологических мембран и что липидный бислой в той или иной мере свойствен природным мембранам. Поэтому теория липидного бислоя, рассматривающая основные термодинамические закономерности его формирования, межмолекулярные взаимодействия в бислое, его физические свойства, устойчивость, играет важную роль в понимании общей структурной организации и функционирования биологических мембран.

§ 3. Термодинамика процессов формирования и устойчивости мембран

Формирование мембран, их стабилизация во многом определяются поверхностными явлениями и межмолекулярными взаимодействиями. Теоретическое изучение свойств высокоорганизованных биологических мембран проводят на примере углеводородных пленок и структур, образуемых липидами в водных средах.

Поверхностная активность, работа адсорбции. Поведение различных соединений в растворах подчиняется адсорбционному уравнению Гиббса:

$$-d\sigma = \sum_{i=1}^m \Gamma_i d\mu_i, \quad (\text{XV.3.1})$$

где σ — межфазное (поверхностное) натяжение, Γ_i — степень адсорбции i -го компонента в поверхностном слое, μ_i — химический потенциал i -го компонента.

Для бинарной системы (например, липид — вода) адсорбционное уравнение Гиббса записывается в виде

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1 + \Gamma_2 d\mu_2. \quad (\text{XV.3.2})$$

При низкой концентрации растворенного вещества, сильно адсорбирующегося на поверхности раздела (весьма реальная ситуация для системы липид — вода), адсорбцию самого растворителя можно приравнять к нулю ($\Gamma_2 = 0$). Тогда

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1. \quad (\text{XV.3.3})$$

Так как для разбавленных растворов

$$d\mu_1 \simeq RT \ln a_1 \simeq RT \ln c_1, \quad (\text{XV.3.4})$$

где a_1 и c_1 — активность и концентрация растворенного вещества, то адсорбционное уравнение принимает вид

$$\Gamma_1 = -a_1 d\sigma / (RT da_1) \simeq -c_1 d\sigma / (RT dc_1). \quad (\text{XV.3.5})$$

Величина $-(d\sigma/dc)_{c \rightarrow 0}$ называется поверхностной активностью. Поверхностно-активными называются вещества, понижающие поверхностное натяжение. Для таких веществ $d\sigma/dc < 0$ и $\Gamma > 0$. К этим соединениям, хорошо адсорбирующимся в поверхностном слое и снижающим поверхностное натяжение, относятся многие органические амфифильные соединения, в частности липиды.

Гидрофобные взаимодействия в мембранах. Стремление амфифильных молекул объединяться в водных растворах в поверхностные или объемные структуры, в которых углеводородные (гидрофобные) участки молекул тесно контактируют друг с другом, рассматривают обычно как результат гидрофобных взаимодействий (см. § 4 гл. IX).

Энергию гидрофобного взаимодействия обычно оценивают, исходя из энергии переноса данного соединения (углеводород, липид) из воды в органическую фазу.

Оценка изменения свободной энергии, энтальпии и энтропии при переносе из воды в неполярный органический растворитель неразветвленных углеводородов показывает, что эти изменения возрастают с ростом длины углеводородной цепи. Причем для не очень длинных цепей наблюдается постоянство инкремента этих термодинамических параметров в пересчете на каждую добавочную CH_2 -группу. Ниже приведены абсолютные значения этих инкрементов, полученные в ряду метан — этан — пропан — бутан при переносе углеводородов из неполярного растворителя в воду непосредственно или через газовую фазу:



Описанные закономерности усложняются при эффектах гидратации полярных головок липидов и электростатических взаимодействий. Для цвиттерионов, полярные головки которых располагаются приблизительно параллельно границе раздела фаз, энергию электростатического взаимодействия между положительно заряженными NH_3^+ или $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -группами и отрицательно заряженными фосфатными группировками соседних молекул можно оценить по скорости вращения полярной головки. Считая, что барьер для вращения головки создается только за счет электростатического взаимодействия, а время корреляции вращения головки составляет $\tau_c \sim 1,5 \cdot 10^{-9}$ с, можно вычислить, что свободная энергия электростатического взаимодействия не превышает $\sim 21 \text{ кДж/моль}$. Энергия же гидратации обычно существенно выше и для одиночных ионов составляет $210\text{—}840 \text{ кДж/моль}$. Это означает, что в полностью гидратированных структурах энергия гидратации выше, чем электростатическая, так что вклад электростатических сил в стабилизацию структур может оказаться существенным только в условиях ограниченной гидратации.

В целом гидратация полярных и заряженных головок липидов существенно влияет на энергетику гидрофобного взаимодействия, увеличивая растворимость липидов в водной фазе. Однако наличие длинных углеводородных цепей в молекулах природных структурообразующих липидов обуславливает их достаточно низкую растворимость в воде. Так, например, критическая концентрация

мицеллообразования (ККМ) для дигексаноиллецитина (6 углеродных атомов) ~ 10 мМ, в то время как для дипальмитоиллецитина (16 углеродных атомов) ККМ $= 5 \cdot 10^{-10}$ М.

Межмолекулярные взаимодействия в тонких пленках и мембранах. Уже простой анализ действия факторов, приводящих к дезинтеграции тонких углеводородных пленок и биологических мембран, позволяет получить определенное представление об особенностях различных межмолекулярных взаимодействий (электростатические и ван-дер-ваальсовы), формирующих эти структуры (см. гл. VIII). В мембранных системах электростатические взаимодействия осуществляются между анионными липидами, amino- и SH-группами аминокислотных остатков белков (положительный заряд), α -карбоксильными группами сиаловой кислоты (отрицательный заряд) и т. д. Условно выделяют три типа электростатических взаимодействий в мембранных системах: латеральное, или тангенциальное, взаимодействие заряженных групп молекул, которые расположены в одном полуслое мембран; трансмембранное взаимодействие заряженных групп — расположены по разные стороны мембраны; межмембранное взаимодействие — заряженные группы расположены на поверхности двух соседних мембран.

Теоретическое описание первого типа взаимодействий в мембранах осложнено трудностями определения точной топографии (размещение) зарядов в мембранах и нахождения диэлектрической проницаемости среды, разделяющей заряды в мембране.

К настоящему времени глубже разработана теория межмембранных электростатических взаимодействий. Однако формальное описание установленных закономерностей достаточно сложно. Не вдаваясь в детали расчетов, укажем, что энергия отталкивания, например, эритроцитов на расстояниях, больших 10 нм, обращается в нуль, а уже при ~ 2 нм она более чем на три порядка превышает энергию теплового движения.

Трансмембранные ионно-электростатические взаимодействия обычно рассматривают по аналогии с плоским конденсатором. Однако теория этого взаимодействия применительно к мембранным системам разработана недостаточно.

В ван-дер-ваальсовых взаимодействиях в мембранах наибольшее значение имеют дисперсионные силы [см. (VIII.1.14)]. Эти силы являются преобладающими во взаимодействиях фаз, разделенных мембраной. Расчет этих взаимодействий проводят путем суммирования парных взаимодействий по всему объему. Для двух фаз, разделенных узким зазором толщиной l , вначале находят энергию парных взаимодействий одной молекулы фазы со всеми остальными молекулами противоположной фазы. Затем интегрируют эти взаимодействия для всех молекул, находящихся в объеме первой фазы. В результате можно определить силы притяжения F , или расклинивающее давление $P_{\text{дисп}}$, приходящееся на единицу площади:

$$P_{\text{дисп}} = -F = -\pi q^2 \beta / (6l^3) = -V / (6\pi l^3), \quad (\text{XV.3.6})$$

где q — число молекул в единице объема, l — толщина зазора между фазами, β — константа дисперсионных взаимодействий Лондона [см. (VIII.1.15)].

Величина

$$V = \pi^2 q^2 \beta \quad (\text{XV.3.7})$$

называется константой Гамакера.

Суммирование парных взаимодействий приводит к резкому возрастанию дальностей дисперсионных взаимодействий между телами. Это приводит к тому, что дисперсионные взаимодействия тел обнаруживаются на расстояниях, существенно превышающих толщину липидных и биологических мембран

вплоть до 100 нм. Отметим также, что для простоты выражение (XV.3.6) получено для взаимодействия двух аналогичных тел через вакуум. Когда тела взаимодействуют через слой, представляющий собой мембранную систему, в приведенных выражениях константа Гамакера должна быть заменена на сложную константу Гамакера, которая учитывает взаимодействие между молекулами разных типов в такой системе.

В отсутствие неоднородностей расклинивающее давление Π в БЛМ можно представить как сумму составляющих:

$$\Pi = \Pi_{\text{дисп}} + \Pi_{\text{эл-стат.}} \quad (\text{XV.3.8})$$

При взаимодействии в растворе однородных клеток, имеющих не слишком большой поверхностный потенциал, дисперсионная составляющая энергии вандер-ваальсова взаимодействия проявляется на больших расстояниях, чем электростатическая (отталкивание). Это означает, что суммарный эффект таких сил может приводить к появлению минимума энергии взаимодействия клеток при расстояниях между ними 3—8 нм. Отсюда следует, что в определенных условиях во взвеси клеток могут находиться клетки, объединенные взаимным притяжением. Они должны отличаться от других клеток рядом свойств, в том числе подвижностью. Существование таких клеток подтверждается экспериментально, например по оседанию эритроцитов или при движении клеток под действием электрического поля. Естественно, что глубина и ширина энергетической «ямы» определяются целым рядом факторов, в том числе плотностью поверхностных зарядов, pH среды, ионной силой и др.

Термодинамика равновесия двусторонних пленок (мембран). Для термодинамического описания мембранных систем используют подход Гиббса, в котором не рассматриваются реальные свойства системы вблизи границы раздела фаз, обусловленные особенностями молекулярных взаимодействий у поверхности (см. гл. XVII — XVIII).

Пользуясь методом Гиббса, можно схематически представить реальную систему, ограничив мембрану с двух сторон разделяющими поверхностями и полагая, что фаза β однородна вплоть до этой поверхности (рис. XV.7). В методе Гиббса определяется толщина мембраны как расстояние между двумя разделяющими поверхностями. Если внутри мембраны сохраняется слой со свойствами объемной фазы, то такую мембрану называют толстой. Для толстых пленок характерно свойство аддитивности, когда значение энергии складывается из ее значений для объемной фазы и поверхностных слоев. При отсутствии слоя со свойствами объемной фазы в пленках наблюдается взаимодействие между поверхностными слоями и условия аддитивности энергии не выполняются. Такие пленки называют тонкими. Подавляющая часть природных мембран удовлетворяет термодинамическим критериям тонких пленок. Важная особенность тонких пленок состоит в том, что давление в фазе, из которой сформирована пленка (мембрана), и давление в окружающей среде не равны. Эту разницу давлений

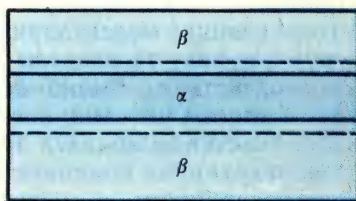


Рис. XV.7. Пленка (α) и часть жидкой фазы (β)

$$p^{\beta} - p^{\alpha} = \Pi \quad (\text{XV.3.9})$$

Б. В. Дерягин назвал расклинивающим давлением. Расклинивающее давление, по сути, обусловлено обобщенным эффектом всех молекулярно-поверхностных сил [см. (XV.3.6)] в тонком слое. В соответствии с определением Дерягина знак давления выбран положительным при наличии отталкивания поверхностных слоев и отрицательным — при притяжении.

Таким образом, тонкие мембраны (пленки) могут быть охарактеризованы не только межфазным натяжением, но и расклинивающим давлением и полным натяжением пленки. Межфазное натяжение [см. (XV.3.1)] представляют как работу изотермического изменения площади (A) пленки при неизменной толщине

$$\sigma = \frac{1}{2}(\partial F / \partial A)_{T, h, n}, \quad (\text{XV.3.10})$$

где F — свободная энергия, T — температура, h — толщина пленки, n — число молекул пленки.

Полное натяжение (v) пленки характеризуют как работу изотермического изменения площади пленки при постоянном объеме (V):

$$v = (\partial F / \partial A)_{T, V, n}. \quad (\text{XV.3.11})$$

Очевидно, что в последнем случае изменяется толщина пленки и приведенное выражение включает составляющую работы за счет изменения расклинивающего давления. В наиболее простом виде взаимосвязь всех этих параметров пленки определяется уравнением

$$v = 2\sigma + Ph. \quad (\text{XV.3.12})$$

В этом уравнении коэффициент 2 введен для учета межфазного натяжения обеих поверхностей пленки.

§ 4. Механические свойства мембран

Подвижность молекулярных компонентов в мембранах. Гидрофобный эффект, объединяющий молекулярные компоненты в мембранах, препятствует их выходу в водную фазу за пределы мембраны. В то же время силы межмолекулярного взаимодействия обычно не мешают молекулам в мембранах обмениваться друг с другом местами, поскольку площадь контакта между водой и гидрофобными участками молекул при этом практически не изменяется. Вследствие этого молекулярные компоненты в мембранных системах сохраняют индивидуальную подвижность и могут диффузионным путем передвигаться в пределах мембран.

Молекулы липидов наиболее легко совершают вращательное движение вокруг своей длинной оси. Время корреляции вращательного движения τ_c молекул (время поворота на угол, равный 1 рад) спин-меченых фосфолипидных молекул, стеринных и жирных кислот в различных модельных и природных мембранах, находящихся в жидком состоянии, составляет $\sim 10^{-9}$ с. Вращательная подвижность сохраняется сравнительно высокой ($\tau_c \sim 10^{-8}$ с) и при температуре ниже точки плавления жирнокислотных цепей липидов в мембранах.

Диффузионное перемещение молекул липидов вдоль слоя, обычно называемое латеральной диффузией, также совершается достаточно быстро. Коэффициент латеральной диффузии (D) спин-меченых и флуоресцентных фосфолипидных зондов во многих искусственных и биологических мембранах составляет $10^{-7} - 10^{-8}$ см²/с (табл. XV.4). Среднеквадратичное расстояние, которое молекула проходит вдоль мембраны за время t , равно

$$\bar{l} = \sqrt{4Dt}. \quad (\text{XV.4.1})$$

Легко вычислить, что при $D = 6 \times 10^{-8}$ см²/с молекула липида за 1 с перемещается по мембране на расстояние порядка 5000 нм, т. е. может «обежать» всю плазматическую мембрану таких клеток, как эритроцит, *E.coli* и др. Скорость

Таблица XV.4. Константы латеральной диффузии липидов в искусственных и природных мембранах

Мембраны	D , $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot 10^8$	Температура, $^{\circ}\text{C}$	Метод
Яичный лецитин (везикулы)	1,8	30	ЯМР
	1,8	25	ЭПР
Яичный лецитин + холестерин (везикулы), 4:1	5	25	ЭПР
	10	40	ЭПР
<i>E.coli</i>	1,8	31	ЯМР
Седалищный нерв	0,5	31	ЯМР
Липиды мембран седалищного нерва	0,8	31	ЯМР
Саркоплазматический ретикулум	1,8	25	ЯМР
Липиды саркоплазматического ретикулума	0,4	31	ЯМР
Микросомы печени	11	30	ЭПР

латеральной диффузии существенно зависит от липидного состава мембран и температуры. Так, холестерин, добавленный к яичному лецитину в количестве 30—50 моль%, снижает скорость латеральной диффузии более чем в два раза. Энергия активации латеральной диффузии в липосомах из яичного лецитина и мембранах саркоплазматического ретикулума при комнатных температурах составляет 29—46 кДж/моль. При температурах ниже точки плавления углеводородных цепей липида константа латеральной диффузии снижается примерно на порядок и более.

Другой тип движения молекул липидов в мембранных системах — это трансбислойное движение (флип-флоп-переход). Оно осуществляется в мембранах с относительно малой скоростью вследствие высокого барьера для пересечения полярной головкой молекулы липида углеводородной зоны мембран. В модельных везикулярных мембранах скорость флип-флоп-перехода, оцененная по времени переноса половины количества молекул-меток из одного слоя в другой, составляет 10—20 ч и более. В природных мембранах этот процесс может идти существенно быстрее. В мембранах электрических органов угря это время составляет 3—7 мин, в мембранах эритроцитов — 20—30 мин. Отмечено, что при добавлении к мембранам клиновидных молекул, индуцирующих появление искривленных структур, а также при нарушении равновесного распределения молекул между слоями (например, при действии фосфолипаз) скорость флип-флоп-перехода резко возрастает. Очевидно, что сохранение асимметричного распределения молекулярных компонентов в искусственных и природных мембранах возможно только при относительно медленной скорости флип-флоп-переходов в этих системах.

Молекулы белков в мембранах также проявляют диффузионную подвижность. Однако вследствие большей массы они движутся существенно медленнее. Так, время корреляции вращения родопсина в фоторецепторных мембранах $\sim 10^{-6}$ с; для цитохромоксидазы это время $\sim 10^{-4}$ с.

Латеральная подвижность белков также существенно ниже, чем липидов. Коэффициенты латеральной диффузии белков в природных мембранах при комнатных температурах обычно находятся в пределах 10^{-10} — 10^{-12} $\text{см}^2/\text{с}$ (табл. XV.5).

Приведенные выше константы латеральной и вращательной диффузии липидных и белковых молекул в мембранах свидетельствуют, что при физиологических условиях мембранные системы проявляют свойства двумерной жидкости. Вязкость (η) этих сред формально можно определить исходя из уравнения Стокса—Эйнштейна:

$$\eta = k_B T / (6\pi D r), \quad (\text{XV.4.2})$$

Таблица XV.5. Константы латеральной диффузии мембранных белков

Клетки	Белки	$D, \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	Температура, °C	Метод
Гетерокарионты (мышь — человек)	Поверхностные антигены	$2 \cdot 10^{-10}$	37	Слияние мембран
Мышечное волокно	Поверхностные антигены	$(1 \div 3) \cdot 10^{-9}$	25	Флуоресцентная метка
«Тени» эритроцитов	Интегральные белки	$4 \cdot 10^{-11}$	37	Слияние
Мышца эмбрионов	Рецепторы конканавалина А	$(4 \div 7) \cdot 10^{-10}$	22	Электрофорез
Наружные сегменты палочек сетчатки	Родопсин	$(2 \div 6) \cdot 10^{-9}$	20	ЭПР
Миобласты	Ацетилхолиновые рецепторы	$(4 \div 5) \cdot 10^{-11}$	22	ЭПР
Фибробласты	Рецепторы гормонов	$(3 \div 5) \cdot 10^{-10}$	23	ЭПР

где r — радиус диффундирующей молекулы. Однако, поскольку мембраны неоднородны и асимметричны, скорость вращения или латеральной диффузии зондов в мембранах определяется микроструктурой их непосредственного окружения. Вследствие этого вязкость, формально вычисленную из параметров подвижности того или иного зонда в мембране, рассматривают как «микровязкость». Под этим подразумевают вязкость однородного эквивалента мембраны, в котором зонд проявляет аналогичную подвижность (ср. § 2 гл. X). Отсюда понятно, что в зависимости от метода измерения подвижности, характера зонда и глубины его локализации в мембране значения микровязкости могут варьировать. Для сравнения в табл. XV. 6 приведены значения микровязкости для ряда природных мембран, углеводородных областей модельных мембран и вязкости некоторых простых сред. В природных мембранах обычно наблюдается некоторое возрастание вязкости липидов, образующих ближайшее окружение мембранных белков, обусловленное ограничением подвижности липидов за счет так называемых белок-липидных взаимодействий и некоторых других эффектов.

Таблица XV.6. Микровязкость углеводородной области липидного бислоя в искусственных и природных мембранах, некоторых маслах и других жидкостях

Объект	Вязкость, П	Температура, °C	Метод измерения
Эритроциты человека	2,5	37	Флуоресцентный зонд
«Тени» эритроцитов	3,8	37	То же
Липиды, экстрагированные из «теней» эритроцитов	3,4	37	»
Мембраны <i>E.coli</i>	2,5	Температура роста	ЭПР-спиновый зонд
Липиды, экстрагированные из мембран <i>E.coli</i>	1,8—1,9	То же	То же
Яичный лецитин	0,73	37	Деполаризация флуоресценции перилена
То же + холестерин (3:2)	6,4	37	То же
Дипальмитоиллецитин	3,9	37	»
То же + холестерин (6:1)	11	37	»
Льняное масло	0,331	30	—
Оливковое масло	0,84	30	—
Касторовое масло	9,86	30	—
Глицерин	8,3	30	—
Вода	0,0106	30	—

Совокупность всех полученных к настоящему времени результатов по оценке вязкости мембран позволяет сделать вывод, что для нормального функционирования большинства природных мембран углеводородная зона должна находиться в жидком состоянии, причем ее вязкость должна быть примерно равна вязкости оливкового масла.

Упругие свойства мембран. Под упругостью мембран (пленки) понимают их способность изменять свое натяжение при растяжении (сжатии). В общем случае реакция мембран на внешние воздействия оказывается сложной и описывается лишь эмпирическими уравнениями. Однако при малых амплитудах и низких скоростях деформации мембран под действием внешних сил процесс с достаточной степенью точности можно рассматривать как термодинамически обратимый.

В равновесных условиях при постоянной температуре упругая потенциальная энергия мембран совпадает со свободной энергией Гельмгольца [см. (V.1.5)]: $F = U - TS$.

Упругий потенциал (F) при постоянной температуре равен работе (W), совершенной над системой:

$$(dF)_T = dU - TdS = dW. \quad (\text{XV.4.3})$$

Допущение, что мембрана изотропна вдоль поверхности, позволяет представить плотность потенциальной энергии упругости как функцию двух независимых переменных, характеризующих два типа деформации: относительного изменения площади поверхности (α) за счет изотропного растяжения (сжатия) и параметра (β), отражающего деформационное растяжение (сдвиг) поверхности при постоянной площади (например, растяжение круглой области в эллипсоидную). Отсюда упругий потенциал можно представить через частные производные по каждому из этих параметров:

$$(dF)_T = \left(\frac{\partial F}{\partial \alpha} \right)_{\beta, T} d\alpha + \left(\frac{\partial F}{\partial \beta} \right)_{\alpha, T} d\beta. \quad (\text{XV.4.4})$$

Противодействие изотропному растяжению (сжатию) является свойством, характерным для твердого и жидкого состояний. В мембранах изотропное растяжение (сжатие) площади поверхности происходит относительно равновесного состояния. Это начальное изотропное натяжение (\bar{T}_0) в мембране можно определить через частную производную свободной энергии в исходном состоянии ($\alpha = 0$):

$$\bar{T}_0 = (\partial F / \partial \alpha)_{\beta, T} \Big|_{\alpha=0}. \quad (\text{XV.4.5})$$

Связь изменения изотропного натяжения с малыми относительными изменениями площади (по сравнению с начальным состоянием) задается модулем поверхностного изотермического сжатия (модуль Юнга):

$$E_{||} = (\partial \bar{T} / \partial \alpha)_{\beta, T} \Big|_{\alpha=0} = (\partial^2 F / \partial \alpha^2) \Big|_{\alpha=0}. \quad (\text{XV.4.6})$$

При деформационном растяжении (при постоянстве площади) накопление энергии и сопротивление деформации характеризуется поверхностным модулем упругости мембран при сдвиге (μ). Этот модуль определяется как частная производная упругой энергии по параметру деформации β при постоянной площади и температуре:

$$\mu = (\partial F / \partial \beta)_{\alpha, T}. \quad (\text{XV.4.7})$$

Эти два модуля — важнейшие характеристики мембран при механических воздействиях. Можно оценить модуль изотермического поверхностного сжатия бислоя в водной фазе, сравнивая площадь, занимаемую молекулой в естественном ненапряженном состоянии, и собственную площадь молекулы, или исключенную площадь. Например, модуль поверхностного упругого сжатия лецитинового бислоя $E_{\parallel} \approx 1,5 \cdot 10^{-3}$ Н/см. В природных мембранах упругие свойства могут существенно изменяться за счет структурных белков. Так, в мембране эритроцитов липидный бислой поддерживается сетью гибких молекул структурного белка спектрина. Модельные расчеты и непосредственные механические измерения на мембранах эритроцитов указывают, что поверхностный модуль упругого сжатия этих мембран равен $(3 \div 4) \cdot 10^{-3}$ Н/см, а поверхностный модуль сдвига $\sim 10^{-5}$ Н/см. Отсюда следует, что значение модуля сдвига примерно на четыре порядка ниже по сравнению с поверхностным модулем упругого сжатия природных мембран. Это означает, что клеточные мембраны сильно сопротивляются изменению поверхностной плотности или площади, но легко деформируются без изменения площади мембраны.

При нагревании мембран эритроцитов до 50°C , когда спектриновая сетка разрушается, поверхностный модуль упругого сжатия снижается примерно в 2—3 раза. Отсюда вклад липидного бислоя в общий модуль поверхностного упругого сжатия мембран эритроцитов оценивают величиной порядка 10^{-3} Н/см, а вклад спектриновой сетки $\sim 2 \cdot 10^{-3}$ Н/см.

Измерение механических характеристик природных мембран — сложная экспериментальная задача, требующая тонких, подчас ювелирных методик (всасывание мембран в микропипетку, одностороннее растяжение мембран, вибрационные методики и др.).

Упругость БЛМ. Ввиду сложности строения и малых геометрических размеров природных мембран исключительно важная роль в изучении упругих свойств мембранных систем принадлежит искусственным мембранным системам и главным образом БЛМ. Эти мембраны, сформированные на отверстиях в перегородках, имеют сравнительно большие площади. Кроме того, экспериментальное изучение механических свойств этих систем возможно при использовании в качестве сжимающей мембрану механической силы давления, создаваемого электрической разностью потенциалов, — явление электрострикции.

В простейшем приближении БЛМ рассматривают как однородное изотропное двумерное жидкое тело с осью симметрии упругих свойств, перпендикулярной его поверхности (рис. XV. 8). Для таких систем модуль поперечной упругости (модуль Юнга) можно представить в виде

$$E'_{\perp} = (-h/\Delta h) \Delta p, \quad (\text{XV.4.8})$$

а модуль продольного изотропного растяжения

$$E'_{\parallel} = (S/\Delta S) \Delta f, \quad (\text{XV.4.9})$$

где p — сила, сдавливающая мембрану в направлении, нормальном к поверхности (S); f — сила изотропного сжатия. Модули упругости мембран рассчитывают с учетом или без учета ее толщины; связь этих модулей задается выражением $E = E'h$, где h — толщина мембраны.

При создании разности электрических потенциалов на мембране сжимающая механическая сила F_e равна

$$F_e = C_m \varphi^2 / (2h_c) = \epsilon \varphi^2 / (2h_c^2), \quad (\text{XV.4.10})$$

где C_m — емкость мембраны, φ — разность потенциалов, h_c — диэлектрическая (емкостная) толщина мембраны, ϵ — диэлектрическая постоянная.

Для оценки реально достигаемых значений давления рассмотрим БЛМ из монолаурилоилглицерида с холестерином. Для этой мембраны $C_m = 0,64$ мкФ/см² ($\varepsilon = 2,1$), а максимальное напряжение $\sim 0,86$ В. Отсюда находим предельное значение $F_E = 81,6$ Н/см², т. е. на мембрану действует давление $\sim 8 \cdot 10^5$ Па. Обычно $C_m \sim 0,38$ мкФ/см²; $\varphi \sim 0,1$ В; $F_E \sim 0,04$ Н/см².

Таким образом, сдавливающую силу F_E можно легко изменять в широких пределах с помощью приложенной разности потенциалов. Приравнивая найденное значение F_E к величине Δp из (XV.4.8), получим выражение

$$|E'_\perp \Delta h/h| = \varepsilon \varphi^2 / (2h_C^2), \quad (\text{XV.4.11})$$

из которого на основании экспериментальных оценок изменения толщины мембраны Δh под действием приложенной разности потенциалов вычисляют модуль E'_\perp упругой деформации БЛМ. Эти методы, однако, не учитывают важных свойств мембран.

Основная сложность вычисления $\Delta h/h$ по величине $\Delta C/C$ обусловлена непостоянством ε и площади S бислойной части БЛМ при наложении разности потенциалов. При этом форма тора и микролинз меняется (см. рис. XV. 6), что приводит к изменению общей площади бислойных участков мембраны и изменению при сжатии бислоя. Кроме того, упругость БЛМ, содержащих растворитель, изменяется со временем, так как растворитель вытесняется из бислоя в тор или микролинзы. Поэтому БЛМ, вообще говоря, следует охарактеризовывать модулем Юнга, зависящим от времени. Результаты измерений на «сухих», бездефектных БЛМ показали, что эти мембраны характеризуются $E'_\perp \sim 5 \cdot 10^4$ Н/см², что близко к значениям модуля упругой деформации винилпласта ($4 \cdot 10^4$) и целлулоида ($1,1 \cdot 10^5$).

Столь высокая устойчивость липидных бислоев в отношении упругой деформации означает, что электрострикционные изменения толщины природных мембран в физиологическом диапазоне трансмембранных потенциалов ($\sim 0,1$ В) не превышают сотых долей нанометра. Следовательно, геометрические изменения толщины природных мембран вряд ли могут играть сколь угодно существенную роль при их функционировании.

Для мембран как однородного изотропного тела значения модулей Юнга E'_\perp (XV.4.8) и E'_\parallel (XV.4.9) должны совпадать. В действительности БЛМ оказались более упругими при их поперечном сжатии, т. е. упругие свойства мембран анизотропны.

Механизмы разрушения липидного бислоя. Приведенные выше характеристики упругих свойств мембранных систем свидетельствуют, что липидный бислой мембран представляет достаточно жесткое структурное образование. Это имеет большое значение для поддержания формы разнообразных клеточных структур и выполнения барьерных функций природными и искусственными мембранами. Однако известно, что время жизни БЛМ ограничено и зависит от состава мембран и внешних условий. В природных мембранах также в ряде случаев возникают механические нарушения и дефекты, причем эти

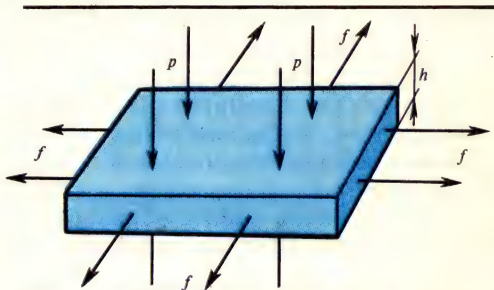


Рис. XV.8. Действующие на мембрану силы (p , f):
 p — сжимающие, f — растягивающие; h — толщина мембраны

явления сопряжены с такими важными биологическими процессами, как слияние клеток, лизис, секреция, гемолиз.

Исходя из общей теории устойчивости условия устойчивости мембран (пленок) записываются в виде следующих простых неравенств:

$$(\partial v / \partial A)_{S,V,n} > 0; (\partial v / \partial h)_{S,V,n} < 0; (\partial \Pi / \partial h)_{S,A,n} < 0. \quad (\text{XV.4.12})$$

Эти неравенства означают, что мембраны устойчивы, когда изменения расклинивающего давления Π [см. (XV.3.9)] или полного натяжения мембран v [см. (XV.3.11)] препятствуют изменениям ее геометрии [ср. (V.1.9a) гл. V].

Обычно процесс разрушения мембран связывают с достижением параметрами системы некоторых критических значений, после чего процесс отклонения становится необратимым и наступает разрушение мембран. Липидные бислои устойчивы лишь при малых изменениях параметров, т. е. представляют собой метастабильные системы.

Отклонение мембран от равновесия можно связать с возникновением дефектов в структуре мембран за счет случайного локального сжатия в продольном или поперечном направлении. Случайное уменьшение толщины мембраны носит резко выраженный локальный характер, что следует рассматривать как начальный этап формирования локального углубления.

Наиболее признанным в настоящее время является механизм разрушения мембран, обусловленный дефектами типа сквозной поры. Предполагают, что в этом случае формирование дефекта сопровождается переориентацией молекул липида, расположенных вблизи границы дефекта с образованием так называемой инвертированной поры. Для приближенного описания охарактеризуем пору радиусом эквивалентного цилиндрического дефекта (r). Энергия E дефекта равна работе образования такого дефекта за вычетом энергии соответствующего бездефектного участка мембраны, т. е.

$$E = 2\pi\tilde{\sigma}r - \pi\sigma r^2, \quad (\text{XV.4.13})$$

где $\tilde{\sigma}$ — линейное натяжение единицы длины периметра дефекта ($\tilde{\sigma} = h\sigma_n$); σ — натяжение мембраны; h — толщина мембраны; σ_n — межфазное натяжение «внутренней» поверхности дефекта (поры).

Эта функция имеет форму кривой с максимумом в точке $r_{кр} = \tilde{\sigma}/\sigma$. Очевидно, что случайные дефекты при $r < r_{кр}$ будут «захлопываться» под действием сил, возникающих при их образовании. В то же время для разрушения БЛМ достаточно появления всего одного дефекта с надкритической величиной радиуса ($r > r_{кр}$).

Многие природные мембраны функционируют в условиях, когда к ним приложена высокая (250—300 мВ) разность электрических потенциалов (см. гл. XXIV), что резко сокращает время жизни БЛМ, хотя кратковременное воздействие электрического поля на БЛМ приводит к увеличению фоновой проводимости и появлению флуктуаций проводимости (см. § 5 гл. XXI). Это указывает на возможность формирования простейших каналов под действием поля, тем более что их появление на БЛМ удается регистрировать и при других модификациях липидов (фазовые переходы при нагревании, введение продуктов перекисного окисления; см. § 1—2 гл. XVI). Поэтому механизмы электрического пробоя БЛМ представляют несомненный интерес для понимания их функционирования.

Один из первых механизмов разрыва мембран в электрическом поле был предложен Дж. Кроули (1973). Согласно этой электромеханической модели мембрану рассматривают как конденсатор с упругим диэлектриком между обкладками. При наложении разности потенциалов электрическая сила

F_E сдвливающая обкладки такого конденсатора, уравнивается силой упругости $F_{упр}$, описываемой законом Гука [ср. (XV.4.11)]:

$$E \ln(h_0/h) = \varepsilon_m \varphi^2 / (2h^2). \quad (XV.4.14)$$

Это уравнение не имеет корней при $\varphi > \varphi_{кр}$, где $\varphi_{кр} = \sqrt{0,376 E h_0^2 / \varepsilon}$. Исчезновение решения объясняется разной зависимостью F_E и $F_{упр}$ от толщины мембраны ($F_E \sim h^{-2}$; $F_{упр} \sim \ln(1/h)$). Отсутствие решения означает возникновение электромеханического коллапса, приводящего к разрушению мембраны при потенциалах, превышающих $\varphi_{кр}$ — потенциал пробоя.

Электромеханическая модель позволяет дать простое объяснение сильной нелинейности вольт-амперных характеристик мембран (см. гл. XIX). Однако в модели рассматривают поведение мембраны как единого однородного тела без учета возможных локальных изменений молекулярной организации липидного бислоя. Кроме того, экспериментальные данные дают существенно более низкое критическое уменьшение (до 20%) толщины мембраны при коллапсе по сравнению с моделью. В настоящее время интенсивно развиваются представления, согласно которым пробой мембран под действием электрического поля обусловлен особенностями поведения локальных дефектов типа сквозной поры в липидном бислое.

Пробой как следствие локальных дефектов.

Наиболее полное экспериментальное и теоретическое исследование электрического пробоя БЛМ проведено в работах Ю. А. Чизмаджеева. Установлено, что среднее время жизни (\bar{t}) БЛМ в электрическом поле падает при увеличении разности потенциалов на мембране (рис. XV.9). Этот факт свидетельствует о том, что термин «потенциал пробоя» ($\varphi_{кр}$), используемый в электромеханической модели, лишен четкого смысла и не может быть использован в качестве параметра устойчивости мембран в электрическом поле.

Рассмотрим, как изменится энергия мембран при появлении в ней цилиндрической поры радиуса r . Для расчета энергии дефекта необходимо учесть работу, связанную с изменением поверхности раздела (увеличение поверхности раздела мембрана — раствор за счет образования боковой поверхности цилиндра и уменьшение поверхности раздела за счет убыли участков, соответствующих торцам цилиндра), и, кроме того, изменение энергии конденсатора в объеме поры, связанное с заменой плохого диэлектрика (липиды с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon_m = 2 \div 3$) на воду ($\varepsilon_s \sim 80$).

Изменение энергии мембраны при образовании в ней цилиндрической поры описывается уравнением

$$E = 2\pi r \bar{\sigma} h - \pi r^2 \sigma - \Delta C \varphi^2 / 2, \quad (XV.4.15)$$

где h — толщина мембраны, r — радиус поры, σ — поверхностное натяжение, т. е. работа, затрачиваемая на образование 1 см^2 поверхности липидного слоя, ΔC — изменение электрической емкости мембраны при появлении в ней структурного дефекта. В (XV.4.15) первые два члена отражают поверхностную энергию дефекта, а последний — изменение электрической энергии мембраны при появлении сквозной поры. Изменение электрической емкости мембраны при появлении поры можно выразить в виде

$$\Delta C = \pi r^2 C_0 (\varepsilon_s / \varepsilon_m - 1), \quad (XV.4.16)$$

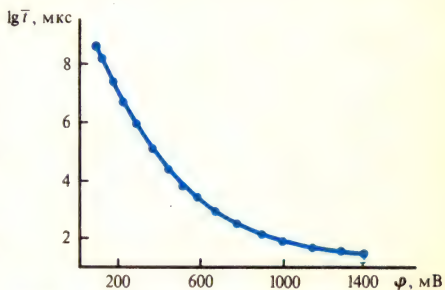


Рис. XV.9. Зависимость среднего времени жизни (\bar{t}) БЛМ из суммарных липидов в декане от разности потенциалов (φ) на мембране

где C_0 — емкость единицы площади мембраны. Следовательно,

$$E = 2\pi\tilde{\sigma}r - \pi r^2(\sigma + C\varphi^2/2), \quad (\text{XV.4.17})$$

где $C = C_0(\epsilon_s/\epsilon_m - 1)$. Зависимость энергии системы от радиуса дефекта, описываемая уравнением (XV.4.17), имеет вид кривой с максимумом (рис. XV.10). Из рисунка видно, что дефекты малого радиуса будут иметь тенденцию к исчезновению. Однако дефекты с радиусом, превышающим некоторое критическое значение $r_{\text{кр}}$, будут необратимо увеличиваться, приводя к разрыву

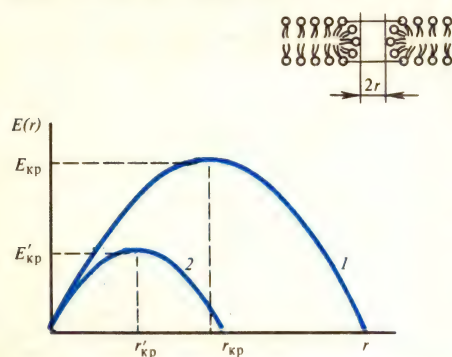


Рис. XV.10. Зависимость энергии дефекта в мембране $E(r)$ от его радиуса r в отсутствие электрического поля и при наложении разности потенциалов φ : 1 — при $\varphi=0$, 2 — при $\varphi>0$; вверху справа — изображение поры в бислое

мембраны. Подведение к мембране разности потенциалов приводит к уменьшению критического радиуса поры и максимального значения энергии (высота энергетического барьера). Именно этим и объясняется увеличение вероятности разрыва мембран в электрическом поле.

Зависимость критического радиуса дефекта, соответствующего точке максимума на кривой $E(r)$, определяется из условия $dE/dr=0$ и описывается соотношением

$$r_0 = \tilde{\sigma}/(\sigma + C\varphi^2/2). \quad (\text{XV.4.18})$$

Подстановкой (XV.4.18) в (XV.4.17) находим зависимость максимального значения энергии E^* от потенциала:

$$E^* = \pi\tilde{\sigma}^2/(\sigma + C\varphi^2/2). \quad (\text{XV.4.19})$$

Таким образом, под действием электрического поля уменьшается энергия образования критического барьера E^* , в результате чего вероятность образования надкритического дефекта возрастает. При возникновении такого дефекта мембрана разрывается самопроизвольно, так как увеличение размера дефекта сопровождается понижением свободной энергии системы.

Согласно теории электрического пробоя, среднее время жизни (\bar{t}) мембран в электрическом поле есть величина, обратная стационарной скорости потока дефектов через энергетический барьер E^* :

$$\bar{t} = 1/j. \quad (\text{XV.4.20})$$

Скорость процесса, энергия активации которого равна E^* , можно в первом приближении описать уравнением

$$j = k_0 e^{-E^*/(k_B T)}. \quad (\text{XV.4.21})$$

Из уравнений (XV.4.20) и (XV.4.21) с учетом (XV.4.19) находим зависимость среднего времени жизни мембран от потенциала:

$$\bar{t} = A e^{E^*/(k_B T)} = A e^{\frac{\pi\tilde{\sigma}^2}{k_B T(\sigma + C\varphi^2/2)}}, \quad (\text{XV.4.22})$$

где A — константа. Соотношение (XV.4.22) описывает в первом приближении зависимость среднего времени жизни мембран от приложенного потенциала.

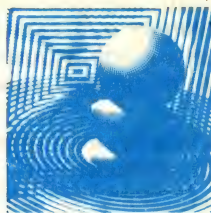
Анализ показывает, что форма зависимости $\bar{t}(\varphi)$ гораздо более чувствительна к изменению параметра $\tilde{\sigma}$, чем к изменению σ . Оказалось, что минимальные значения $\tilde{\sigma}$ характерны для мембран из лизолецитина, молекулу которого можно представить в виде конуса: основанием его служит большая полярная

часть молекулы, вершиной — гидрофобный жирнокислотный остаток. Для мембран из лецитина, молекулы которого имеют цилиндрическую форму, характерны промежуточные значения σ . Максимальные значения σ свойственны мембранам из фосфолипидов типа фосфатидилэтаноламина, молекулы которых имеют форму конуса с малой полярной головой и большим гидрофобным основанием.

По-видимому, вероятность локальных искажений бислоя с образованием дефектов типа сквозных пор зависит от геометрии липидных молекул. Молекулы конической формы типа лизолецитина, находясь в бислое, проявляют большую склонность к образованию водных пор по сравнению с молекулами, имеющими форму цилиндра или перевернутого конуса. Таким образом, значения σ , вероятно, характеризуют спонтанную кривизну мембран из различных фосфолипидов.

Глава XVI

Конформационные свойства мембран



§ 1. Фазовые переходы в мембранных системах

Природные и искусственные мембранные системы могут находиться в двух основных фазовых состояниях: в виде твердого двумерного кристалла (гель) или в жидкокристаллическом (расплавленное) состоянии.

Температурная точка основного фазового перехода, или параметр $T_{\text{фп}}$ систем, образованных из индивидуальных липидов, в сильной степени зависит от длины и степени ненасыщенности углеводородных цепей липидов. Температура фазового перехода увеличивается с увеличением длины цепей и уменьшается с увеличением степени ненасыщенности жирнокислотных остатков.

Жирнокислотные цепи природных липидов обычно содержат ненасыщенные связи. Вследствие этого у большинства природных мембран $T_{\text{фп}}$ лежит в области отрицательных температур, т. е. в естественных условиях они находятся в «жидком» состоянии. Основной фазовый переход в этих мембранах происходит лишь после того, как они окажутся «вморожены» в водную фазу.

В искусственных и реконструированных мембранных системах, построенных из индивидуальных синтетических, как правило насыщенных, липидов, точки фазовых переходов лежат в области положительных температур. Аналогичная картина наблюдается у некоторых ауксотрофных микроорганизмов, которые не способны синтезировать жирные кислоты и используют для построения собственных мембран только липиды, присутствующие в питательной среде. В отношении структурных перестроек переход гель — жидкокристаллическое состояние представляет собой переход углеводородных цепей из полностью транс-состояния в разупорядоченное состояние (жидкоподобная α -фаза). При таких переходах площадь, приходящаяся на молекулу липида, меняется. Например, для мембран из дипальмитоиллецитина она меняется от 0,48 до 0,58 нм², среднее расстояние между цепями увеличивается от ~0,49 до 0,53 нм, а толщина углеводородного слоя уменьшается почти на 0,5 нм. Относительное изменение объема при фазовом переходе невелико: $\Delta V/V \sim 1,5\%$. Это означает, что латеральное расширение компенсируется утоньшением слоя.

Гипотеза петли (кинка). Плавление жирнокислотных цепей при фазовом переходе обусловлено вращательной изомеризацией (см. § 3 гл. VIII). Наименьшей энергией обладает транс-, а наибольшей — цис-конфигурация.

Гош-конформации (гош (+) и гош (—); поворот на $\pm 120^\circ$ относительно транс-конформации) сравнительно мало превышают по энергии транс-конформацию (на 2—3 кДж/моль), но эти состояния разделяет энергетический барьер высотой ~12—17 кДж/моль. Если углеводородные цепи в полностью транс-конфигурации представляют собой линейные структуры, то появление

одиночной гош-конформации в цепи приводит к искривлению пространственной конфигурации цепи на угол $\sim 120^\circ$ (см. рис. VIII.6—VIII.8). В плотноупакованных мембранных системах с полностью транс-конформацией углеводородных цепей это искривление порождает серьезные стерические затруднения, делающие невозможным появление одиночных гош-конформаций.

Уменьшение стерических затруднений при плавлении углеводородных цепей в мембранах достигается при синхронном появлении в цепи сразу двух гош-конформаций (гош (+) и гош (−)), разделенных С—С-связью в транс-конформации. Хотя энергия такого состояния вдвое выше одиночной гош-конформации, возникающее ротационное состояние цепи не вызывает сильного расширения решетки, так как при последовательном повороте цепи на $+120^\circ$ и -120° пространственная конфигурация цепи в целом сохраняется прямолинейной (рис. XVI.1). Участок цепи, находящийся в гош (+)-транс-гош (−)-конформации, формирует уступ или петлю в углеводородной цепи, которую часто называют кинком (от англ. *kink* — петля).

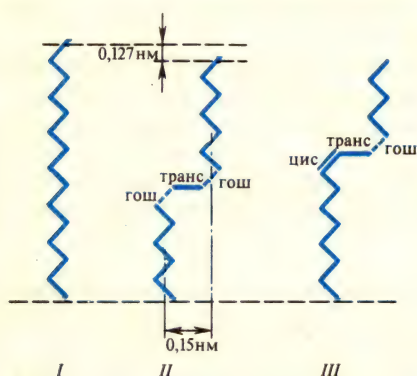


Рис. XVI.1. Углеводородные цепи в полностью транс-конформации (I), гош-транс-гош-конформации (II), цис-транс-гош-конформации (III)

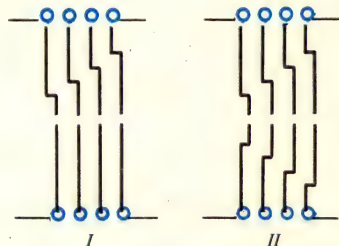


Рис. XVI.2. Кинк-блоки в углеводородных цепях мембран: I — в одном полуслое, II — в двух монослоях липидного бислоя

Образование кинка сопровождается уменьшением эффективной длины цепи на $\sim 0,127$ нм. При этом часть цепи отодвигается на $\sim 0,15$ нм, образуя свободный объем, а занимаемый молекулой липида общий объем увеличивается на $0,025\text{—}0,050$ нм³ (рис. XVI.1).

Хотя появления одного кинка в углеводородной цепи недостаточно для ее плавления, однако одиночные кинки облегчают возникновение кинков в соседних углеводородных цепях, формируя чередующиеся кинк-блоки (рис. XVI.2). Такие блоки могут возникать либо в одном полуслое мембраны, либо в двух противоположно расположенных углеводородных цепях. При увеличении числа кинков в углеводородных цепях разупорядоченность углеводородной зоны мембран резко нарастает.

Двойные (цис-) связи в жирнокислотных ненасыщенных цепях мембран могут играть роль зародышей образования кинков в соседних насыщенных цепях. В этом случае для образования кинка в ненасыщенной цепи необходимо появление лишь одной гош-конформации при искривлении цепи на 80° .

При этом устраняются стерические затруднения, возникающие при размещении ненасыщенной цепи в углеводородной зоне мембран из насыщенных липидов [см. (XVI.1)], что хорошо согласуется с экспериментально наблюдаемым резким снижением $T_{\text{фл}}$ мембран из насыщенных липидов при добавлении к ним небольших количеств ненасыщенных жирнокислотных цепей. Поворот вокруг $\text{C}=\text{C}$ -связи с образованием транс-конформации практически исключен (см. § 3 гл. VIII; § 3 гл. IX).

Таким образом, низкую вязкость (высокая текучесть) углеводородной зоны мембран в жидкокристаллическом состоянии (при $T > T_{\text{фл}}$) связывают с возрастанием амплитуды крутильных осцилляций вокруг $\text{C}-\text{C}$ -связей, появлением гош-конформаций (кинки) и их быстрой изомеризацией в соседние положения.

Для оценки эффективности этих процессов полезно сопоставить частоту крутильных колебаний вокруг $\text{C}-\text{C}$ -связей $(6 \div 8) \cdot 10^{12} \text{с}^{-1}$ с частотой возникновения гош-конформаций при комнатных температурах. Полагая, что величина барьера, отделяющего транс- от гош-конформации, равна $\sim 12 \text{ кДж/моль}$, находим $\nu = (k_B T/h) \exp[-\Delta E/(RT)] \approx 10^{10} \text{с}^{-1}$ [см. (XIV.1.1)]. Отсюда следует, что гош-конформации при комнатных температурах возникают с высокой частотой вследствие крутильных осцилляций.

В условиях высокой текучести гидрофобной зоны мембран кинк может изомеризоваться, смещаясь вдоль углеводородной цепи за счет синхронного поворота на 120° соответствующей последовательности $\text{C}-\text{C}$ -связей. При смещении в соседнее положение кинк передвигается на $\sim 0,13 \text{ нм}$. Такое перемещение кинка вдоль углеводородной цепи можно рассматривать как своеобразную одномерную диффузию, которую можно охарактеризовать коэффициентом диффузии (D_k):

$$D_k = 0,5 \nu_k (\Delta L)^2, \quad (\text{XVI.1.1})$$

где ν_k — частота скачка кинка, ΔL — шаг одного скачка. Полагая, что частота скачка кинка по порядку величины соответствует частоте появления гош-конформаций ($\sim 10^{10} \text{с}^{-1}$), находим $D_k \sim 10^{-5} \text{см}^2/\text{с}$. Полученное значение практически совпадает с известными коэффициентами проницаемости липидных мембран для кислорода, воды и небольших молекул неэлектролитов. Это совпадение, а также геометрическое соответствие размеров таких молекул и свободного объема, возникающего при образовании кинка, послужило основанием для утверждения, что трансмембранный перенос малых молекул осуществляется внутри свободного объема, образуемого кинком.

Молекулярный параметр порядка. Высокая подвижность углеводородных цепей в мембранах позволяет судить лишь о динамической конформации этих структур или о наиболее вероятной (средняя) форме цепей. Даже в твердом бислое при полностью транс-конформации обнаруживается подвижность звеньев углеводородных цепей, которая заметно возрастает к концу цепи по мере удаления от карбонильного атома. При этом нарушения транс-конфигурации не происходит, а подвижность звеньев возрастает за счет последовательного суммирования к концу цепи небольших амплитуд одиночных торсионных осцилляций. В «жидком» бислое вращательный беспорядок резко нарастает за счет транс-гош-ротамеризации.

При температурах выше точки основного фазового перехода гибкие углеводородные цепи стремятся принять конфигурацию статистического клубка. Этому, однако, препятствуют силы поверхностного натяжения, мешающие возрастанию эффективной площади на молекулу в бислое. В результате наблюдается некоторое увеличение площади на молекулу, однако при этом в мембранах реализуются далеко не все возможные конформации цепей.

Для описания динамического отклонения конформации таких цепей от нормали к поверхности используют молекулярный параметр порядка (S_n):

$$S_n = \frac{3}{2} \overline{\cos^2 \beta_n} - \frac{1}{2}, \quad (\text{XVI.1.2})$$

где β_n — угол между нормалью к бислою и нормалью к плоскости, образованной двумя векторами С—Н-связей n -го сегмента цепи (рис. XVI.3). Очевидно, что при идеальной упорядоченности $S=1$, а для изотропной среды $S=0$.

На рис. XVI.4 показано, как изменяется S для каждого последующего дейтерированного звена в пальмитиновой кислоте, биосинтетически включенной в мембраны микоплазмы *A. laidlawii*. Аналогичное распределение параметра

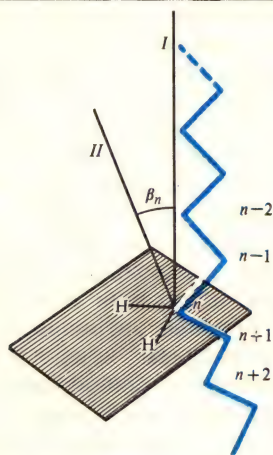


Рис. XVI.3. Нахождение угла β между нормалью (I) к поверхности мембраны и нормалью (II) к плоскости, образованной двумя векторами С—Н-связей n -го сегмента углеводородной цепи

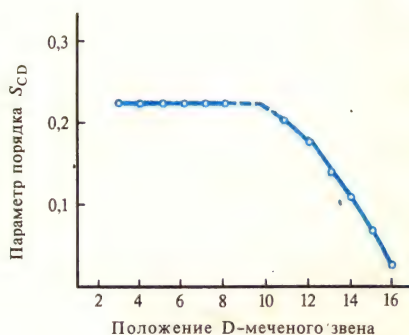


Рис. XVI.4. Зависимость параметра порядка S_{CD} -связи от положения дейтерированного звена в пальмитиновой цепи, биосинтетически включенной в мембраны микоплазм *A. laidlawii* при 42°C ($S_D = 0,5S_{CH}$)

порядка S вдоль цепи наблюдается и в бислоях яичного лецитина или некоторых синтетических липидов.

Как видно, после 8—9-го метиленового звена разупорядоченность резко возрастает, приближаясь к изотропному движению у концевых метильных групп. Возможно, что начальные плотноупакованные участки углеводородной зоны обеспечивают когезионные взаимодействия между цепями, необходимые наряду с гидрофобными эффектами для поддержания целостности бислоя. В то же время «жидкая» углеводородная середина обеспечивает заполнение возможных дефектов в гетерогенных системах и поддерживает вязкость системы на необходимом низком уровне. Примечательно в связи с этим, что в большинстве природных ненасыщенных жирных кислот двойные связи размещаются после 9-го углеродного атома и таким образом прямо не снижают плотность упаковки начальных участков углеводородных цепей.

Для экспериментального определения параметра порядка применяют ЯМР-метки, которыми являются липиды, дейтерированные в разных метиленовых положениях углеводородной цепи или меченные ядрами ^{13}C . Используют также спин-меченные липиды, в которых парамагнитные группы связаны с

разными углеродными атомами углеводородной цепи. В последнее время благодаря усовершенствованию техники метода ЯМР стало возможным определять S по параметрам релаксации ядер ^{13}C , присутствующих в углеводородах мембран за счет естественного содержания изотопа.

Термодинамические параметры фазовых переходов. С термодинамической точки зрения фазовые переходы в мембранных системах можно рассматривать как превращения агрегатных состояний ($1 \leftrightarrow 2$).

При фазовом переходе в мембранах изменяются скачком упорядоченность системы (энтропия) и ее объем, т. е. объем и энтропия системы, являющиеся первыми производными свободной энергии ($\partial G/\partial T = -S$ и $(\partial G/\partial p) = V$, претерпевают разрыв в точке фазового перехода. Это означает, что фазовые переходы в мембранах относятся к переходам первого рода (см. § 3 гл. VII).

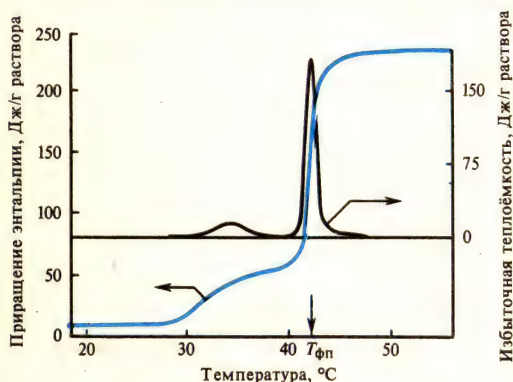


Рис. XVI.5. Зависимость приращения энтальпии и избыточной удельной теплоемкости дисперсии дипальмитонилфосфатидилхолина от температуры

Типичные экспериментальные кривые изменения теплоты и теплоемкости при фазовом переходе приведены на рис. XVI.5. Измерив поглощение теплоты при фазовом переходе ΔQ и зная количество образца в пробе m (в молях), можно рассчитать молярную энтальпию перехода $\Delta H = \Delta Q/m$ и затем молярную энтропию перехода $\Delta S = \Delta H/T$.

При плавлении кристаллов общее изменение энтропии обусловлено увеличением конформационной, позиционной и ориентационной разупорядоченности. В мембранах при плавлении углеводородных цепей, находящихся полностью в транс-конформации, основной вклад в изменение энтропии обусловлен возможностью появления новых конфи-

гураций за счет транс-гош-изомеризации. Отсюда фазовый переход в мембранах можно рассматривать как конфигурационное плавление.

Для фосфатидилхолинов наблюдается линейная зависимость приращения энтропии при фазовом переходе от длины углеводородных цепей n при $14 \leq n \leq 22$. Инкремент приращения энтропии на одну СН-группу составляет $\Delta S \approx 5,25 \text{ Дж} \cdot \text{град}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$. Это позволяет исходя из Больцмановского определения энтропии оценить вероятность транс-состояний p_t при температурах, несколько превышающих точку фазового перехода. Пользуясь уравнением

$$\Delta S = R \left[p_t \ln \frac{1}{p_t} + (1 - p_t) \ln \frac{2}{1 - p_t} \right],$$

можно показать, что для фосфатидилхолинов вероятность нахождения CH_2 -группы в транс-конформации $p_t \approx 0,8$. Поскольку $p_t + 2p_g = 1$, вероятность гош-конформации $p_g \approx 0,1$. Из полученных значений вероятности следует, что при температурах выше точки фазового перехода в углеводородных цепях из 16 углеродных атомов в среднем возникает $\sim 2,8$ гош-конформаций.

Фазовые переходы в липидных бислоях происходят в сравнительно широком температурном интервале ($\Delta t \sim 0,2 \div 1,0^\circ\text{C}$). Это обусловлено тем, что в бислое одна фаза обязательно возникает в матриксе другой фазы («жидкий» и «твердый» бислои) с образованием большого числа доменов новой фазы микроскопических размеров, но с большой удельной площадью поверхностей.

По границе домена молекулы находятся в необычной упаковке, что отражается на внутреннем поверхностном натяжении σ . Вследствие изменения объема системы при фазовых переходах на границе раздела фаз (доменов) будут действовать механические силы (χ). В результате жидкокристаллические фазы доменов будут находиться под влиянием сил сжатия, а гель-объемы — испытывать растяжение. Следовательно, для двух сосуществующих фаз (1 и 2) в липидном бислое появляется дополнительная зависимость их энергии (G_1 и G_2) от внутреннего поверхностного натяжения и механических сил:

$$G_1 = f(T, p, \sigma_{1,2}, \chi_{1,2}) \text{ и } G_2 = f(T, p, \sigma_{2,1}, \chi_{2,1}).$$

В результате сложное равновесие между фазами устанавливается в сравнительно широком температурном интервале и крутизна фазового перехода уменьшается, что указывает на снижение степени кооперативности перехода (см. § 5 гл. IX). Резкий переход возможен только в случае бесконечной кооперативной единицы, образованной взаимодействующими молекулами, что соответствует плавлению совершенного кристалла. В липидах мембранных структур число молекул N , объединяющихся в кооперативные единицы, не превышает нескольких сотен. Это означает, что в мембранах макроскопических размеров возникает огромное число мозаично разбросанных кооперативных единиц, которые по закону «все или ничего» находятся в виде одной (А) либо другой (В) фазы:



Если долю молекул (или кооперативных единиц) в состоянии А и В обозначить C_A и C_B , то степень перехода Θ можно охарактеризовать как

$$\Theta = C_A / C_B. \quad (\text{XVI.1.3})$$

Кажущаяся константа равновесия этого процесса равна

$$K = k_1 / k_2 = \Theta / (1 - \Theta). \quad (\text{XVI.1.4})$$

Подход к фазовому превращению как к химической реакции позволяет описать зависимость K от температуры с помощью уравнения Вант-Гоффа:

$$d \ln K / dT = \Delta H_{\text{вг}} / (RT^2) = [1/\Theta (1 - \Theta)] (d\Theta / dT), \quad (\text{XVI.1.5})$$

где $\Delta H_{\text{вг}}$ — теоретическая теплота реакции или энтальпия Вант-Гоффа.

Так как в средней точке перехода $\Theta = 0,5$ (при $T = T_{\text{фп}}$), то

$$\Delta H_{\text{вг}} / (4RT_{\text{фп}}^2) = (d\Theta / dT)_{T_{\text{фп}}},$$

что совпадает с уравнением (IX.5.3).

Зависимость Θ от температуры может быть найдена экспериментальным путем с помощью калориметрических, радиоспектральных и флуоресцентных методов. Предложено несколько приближенных методов оценки энтальпии Вант-Гоффа, например по полуширине перехода $\Delta T_{1/2}$:

$$\Delta H_{\text{вг}} \approx 7T_{\text{фп}}^2 / \Delta T_{1/2}. \quad (\text{XVI.1.6})$$

Для оценки степени кооперативности процесса сравнивают вычисленную $\Delta H_{\text{вг}}$ и измеряемую калориметрически теплоту перехода (ΔQ). При отсутствии кооперативности $\Delta \Theta / \Delta H_{\text{вг}} = 1$, а для кооперативного процесса эта величина много меньше единицы. В общем виде степень кооперативности задается соотношением [ср. (IX.5.3)] $\Delta H_{\text{вг}} = N \Delta Q$, где N — число молекул в кооперативной единице. Для характеристики степени кооперативности

процесса часто используют также параметр кооперативности (σ) [см. (IX.5.6)] $\sigma = (\Delta Q / \Delta H_{\text{вг}})^2$. Очевидно, что чем меньше σ , тем больше кооперативность процесса. Связь параметра кооперативности с размером кооперативной единицы определяется выражением

$$N = 1/\sqrt{\sigma}. \quad (\text{XVI.1.7})$$

Вычисленные из экспериментальных данных (при фазовых переходах) размеры кооперативных единиц в мембранах липосом, состоящих из различных фосфолипидов, представлены ниже.

Фосфолипид	Количество молекул в кооперативной единице N
Димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ)	200 ± 40
Дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ)	70 ± 10
Дистеарилфосфатидилхолин (ДСФХ)	80 ± 10
Димиристоилфосфатидилэтаноламин (ДМФЭ)	$70(100)$
Дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДПФЭ)	260
Дилаурилфосфатидилэтаноламин (ДЛФЭ)	440

Следует, однако, с осторожностью использовать уравнение Вант-Гоффа и калориметрические данные, которые могут зависеть не только от изменения теплоемкости, но и от внутримолекулярных перестроек в биомембранах (ср. § 3 гл. VII).

Особенности протекания фазовых переходов в мембранных системах могут быть связаны с появлением у них гистерезиса, т. е. смещения

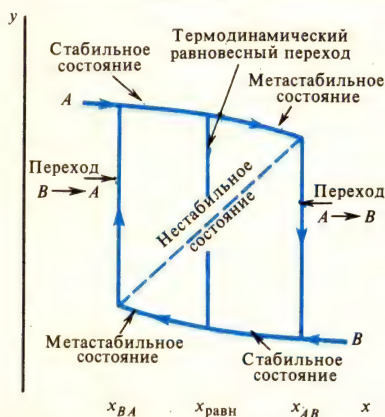


Рис. XVI.6. Фазовый переход через метастабильное состояние (гистерезис)

Переход в направлении $A \rightarrow B$ при изменении независимой переменной x (например, температуры) происходит через метастабильное состояние при изменении независимой переменной от $x_{\text{равн}}$ до x_{AB} . Собственно переход от A к B происходит при x_{AB} . В случае обратного перехода от B к A система вновь попадает в метастабильное состояние при изменении независимой переменной от $x_{\text{равн}}$ до x_{BA} и переход от B к A осуществляется в точке x_{BA} .

точки фазового перехода, регистрируемой при нагревании или охлаждении системы. Появление гистерезиса возможно, когда кинетические барьеры для фазового перехода достаточно высоки, так что затрудняется установление термодинамического равновесия между фазами при температуре равновесного перехода. В результате процесс перехода совершается через метастабильное состояние (рис. XVI.6).

Экспериментально гистерезис обнаружен в искусственных мембранных системах из синтетических и природных липидов. Например, для ДПФХ и ДМФХ гистерезисное смещение $T_{\text{фл}}$ в определенных условиях может достигать

3—5°C. Гистерезисная петля обнаружена и в ряде природных мембран, причем гистерезисное смещение $T_{\text{фп}}$ в мембранах *E.coli* оказалось существенно больше, чем в искусственных мембранах, построенных из липидов, которые были выделены из мембран этих микроорганизмов. Примечательно, что гистерезис проявляется и на функциональных характеристиках биологических мембран. Так, широкая гистерезисная петля ($\sim 10^\circ\text{C}$) наблюдается при регистрации потенциала действия на гигантском аксоне кальмара.

§ 2. Теории фазового перехода

Попытки теоретически описать фазовые переходы липидов в мембранах предпринимались неоднократно. В общих теориях стремятся дать полное описание процесса и вычислить температуру фазового перехода и его тепловой эффект. Возможные конфигурации липидов, определяющие фазовый переход, находят, исходя из анализа энергии системы, представляющей собой сумму энергий внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий. Наиболее простая модель, предложенная Дж. Ф. Найглом (1973), рассматривает фазовый переход бислоя в рамках поворотного-изомерной теории (см. § 3 гл. VIII) как переход порядок — беспорядок с допущением произвольного сочетания транс- и гош-конформаций в каждой цепи. При подсчете числа возможных конфигураций предполагают, что соседние цепи находятся в одной плоскости и их углеродные атомы могут занимать ячейки плоской гексагональной решетки. Стерические ограничения учитывают путем допущения, что в одной ячейке решетки не может находиться более одного С-атома. Вычисленная на основе такого грубого двумерного приближения теплота перехода оказалась достаточно близкой к экспериментально измеренным величинам.

Модели фазового перехода, учитывающие большее число факторов, построены на основе теории молекулярного поля с использованием понятия «параметра порядка». В этих моделях полагают, что конфигурация системы липидных молекул, подобно нематическим жидким кристаллам, определяется взаимной ориентацией соседних молекул.

В модели, предложенной С. Марчелли (1974), энергию углеводородной цепи с конфигурацией i в бислое определяют следующим образом:

$$E^i = E_{\text{вн}}^i + E_{\text{дисп}}^i + pA^i. \quad (\text{XVI.2.1})$$

Первый член ($E_{\text{вн}}^i$) представляет собой внутримолекулярную энергию цепи, которую находят с помощью поворотного-изомерной теории.

Третий член (pA) введен для учета бокового давления на цепь в бислое, возникающего за счет стерического отталкивания, электростатических взаимодействий и гидрофобного эффекта. Обычно в расчетах принимают, что значения p составляют $\sim 2 \cdot 10^{-4} \text{ Н/см}$; A — эффективная площадь продольного сечения цепи $\sim 0,2 \text{ нм}^2$.

Второй член ($E_{\text{дисп}}$) введен для учета межмолекулярных дисперсионных взаимодействий. Используя понятие «средняя упорядоченность в цепи» [см. (XVI.1.2)]

$$\frac{1}{n} \sum_n \left(\frac{3}{2} \cos^2 \beta_n - \frac{1}{2} \right), \quad (\text{XVI.2.2})$$

энергию дисперсионного взаимодействия записывают в виде

$$E_{\text{дисп}}^i = -\Phi^i \left(\frac{n_i}{n} \right) \frac{1}{n} \sum_n \left(\frac{3}{2} \cos^2 \beta_n - \frac{1}{2} \right)_i, \quad (\text{XVI.2.3})$$

где Φ — энергия молекулярного поля, зависящая, в свою очередь, от упорядоченности системы:

$$\Phi^i = V \left\langle \frac{n_i^i}{n^2} \sum \left(\frac{3}{2} \cos^2 \beta_n - \frac{1}{2} \right)_i \right\rangle. \quad (\text{XVI.2.4})$$

Здесь V — свободный параметр, являющийся константой взаимодействия между соседними цепями; n_i^i/n — доля связей в транс-конформации для i -й конфигурации цепи. Молекулярное поле принимают постоянным во всем объеме бислоя.

Таким образом, энергия цепи зависит от ее конфигурации, величины молекулярного поля Φ^i и продольного давления p :

$$E_{\Phi^i, p}^i = E_{\text{вн}}^i - \Phi^i \left(\frac{n_i^i}{n^2} \right) \sum \left(\frac{3}{2} \cos^2 \beta_n - \frac{1}{2} \right) + pA^i. \quad (\text{XVI.2.5})$$

Статистическая вероятность (p) i -й конфигурации цепи равна [см. (VIII.3.9)]

$$p = \frac{\exp[-E^i/(k_B T)]}{\sum_n \exp[-E^i/(k_B T)]} = \exp[-E^i/(k_B T)] \frac{1}{Z}, \quad (\text{XVI.2.6})$$

где Z — статистическая сумма состояний.

С учетом этого среднее значение молекулярного поля Φ^i можно представить в виде

$$\Phi^i = \frac{V}{Z} \left[\sum_{\text{все конформации}} \left(\frac{n_i^i}{n^2} \right) \sum_n \left(\frac{3}{2} \cos^2 \beta_n - \frac{1}{2} \right) \exp \left(-\frac{E^i}{k_B T} \right) \right]. \quad (\text{XVI.2.7})$$

Так как Φ^i является функцией E^i , которая, в свою очередь, зависит от Φ^i , записанные уравнения представляют собой систему уравнений самосогласованного поля. Такие уравнения решаются численно методом повторений (итерация). Значение термодинамических параметров перехода находят из средних конформаций цепей, вычисляемых на основании статистического веса и вероятности различных конфигураций (см. § 3 гл. VIII).

Модель Марчелли позволяет рассчитать температуру и тепловой эффект перехода, а также основные геометрические параметры цепей, которые находятся в хорошем соответствии с экспериментом.

Фазовые переходы в липидах мембран удается описать в более общем виде с помощью феноменологической теории Ландау. Она позволяет представить термодинамический потенциал (свободная энергия) вблизи точки фазового перехода в виде степенного разложения по параметру порядка η :

$$G_\eta = a_1 \eta + \frac{1}{2} a_2 \eta^2 - \frac{1}{3} a_3 \eta^3 + \frac{1}{4} a_4 \eta^4. \quad (\text{XVI.2.8})$$

Здесь $a_1 = p(S_f - S_s)$; p — латеральное давление, S_f и S_s — поверхностные площади на молекулу в жидкокристаллическом и твердом состоянии; a_2, \dots, a_4 — коэффициенты, которые могут быть найдены по зависимости $T_{\text{фп}}$ и η от латерального давления (p).

Параметры фазового перехода находят, минимизируя зависимость G_η от T и η . В теории Ландау параметр порядка определен несколько иным образом — через изменение поверхностной площади молекул при фазовом переходе:

$$\eta = (S_f - S)/(S_f - S_s), \quad (\text{XVI.2.9})$$

где S — реальная поверхностная площадь на одну молекулу.

С помощью этого подхода рассмотрено влияние холестерина и белков на фазовые переходы и исследована зависимость параметра порядка липидов в ближайшем окружении молекул белков и холестерина в мембранах. Результаты этих работ в целом согласуются с результатами, полученными из модели Марчелли, в частности они указывают, что липиды могут образовывать несколько молекулярных слоев с постепенно меняющейся упорядоченностью вокруг белковых молекул.

Частные теории посвящены описанию зависимости фазовых переходов в бислое от параметров системы. В модели Трейбла и Эйбла (1974) в качестве такого параметра рассматривают свойства полярных групп липидов. В противоположность электронейтральным (цвиттерионные) липидам у заряженных липидов обычно наблюдается четкая зависимость температуры перехода от многих факторов, определяющих заряд липидов (рН, ионная сила, адсорбция ионов и т. д.). Если бы взаимодействие заряженных групп сводилось к простому отталкиванию одноименных зарядов, то фазовые переходы в заряженных липидах должны были бы происходить при более низких температурах, чем в электронейтральных. Фактически наблюдается обратная картина. В модели вклад электростатического взаимодействия в изменение энтальпии при фазовом переходе определялся в предположении, что свободная энергия заряженной поверхности зависит от плотности поверхностного заряда. В том случае, если заряды на поверхности липидного бислоя распределены равномерно, свободная энергия двойного электрического слоя ϕ может быть рассчитана по уравнению Гуи—Чэпмена (см. § 5 гл. XVIII).

Поскольку площадь, занимаемая молекулой липида в «твердом» бислое, меньше, чем в «жидком», плотность поверхностного заряда и, следовательно, свободная электростатическая энергия должны уменьшаться при фазовом переходе геля в жидкокристаллическое состояние.

Считая, что энтальпия фазового перехода состоит из неэлектростатического компонента ΔH и электростатического члена $\Delta E_{эл}$, температуру фазового перехода T^* для заряженных липидов можно записать в виде

$$T^* = \Delta H / \Delta S + \Delta E_{эл} / \Delta S. \quad (\text{XVI.2.10})$$

Смещение точки фазового перехода ΔT для заряженных липидов определяется выражением

$$\Delta T = T^* - T = \Delta E_{эл} / \Delta S = - \frac{2RT}{\Delta S} \left[\Delta A / A_1 - (\Delta A)^2 / (A_1 A_2) \right] a, \quad (\text{XVI.2.11})$$

где A_1, A_2 — площади, занимаемые молекулой в «твердом» и «жидком» бислоях; a — степень диссоциации соответствующей группы; $\Delta A = A_2 - A_1$.

В предположении, что ΔS не зависит от рН, по этому уравнению можно предсказать, что температура фазового перехода, например фосфатидной кислоты, должна уменьшаться на $\sim 20^\circ\text{C}$ при переходе от протонированной к полностью ионизированной форме молекулы липида. Экспериментальная проверка показала достаточно хорошее совпадение реальных значений с теоретическим расчетом.

В целом термодинамические теории хорошо описывают влияние одновалентных катионов на $T_{фп}$.

§ 3. Особенности межмолекулярных взаимодействий в мембранах

В реальных условиях не только природные, но часто и искусственные мембраны существенно неоднородны по липидному или белковому составу. В структурной организации и стабилизации таких систем наряду с обычными гидрофоб-

ными эффектами важное место занимают так называемые липид-белковые и белок-белковые взаимодействия. Эти термины используют для обозначения широкого круга разнообразных, отличающихся по механизмам явлений, которые приводят к неравномерному распределению молекулярных компонентов в мембранах — микрогетерогенности мембран.

Липид-липидные взаимодействия. Этот термин обычно используют, чтобы выделить специфические взаимодействия, возникающие в мембранных системах вследствие неоднородности липидного состава.

Энергию взаимодействия системы, состоящей из двух липидных компонентов A и B , можно представить в виде парных потенциалов Φ_{AA} , Φ_{BB} и Φ_{AB} . Если разность $\Phi_{AB} - 1/2(\Phi_{AA} + \Phi_{BB})$ мала, то в системе будет наблюдаться равномерное распределение компонентов A и B . Когда же потенциалы взаимодействия сильно различаются, становится возможным скомпенсировать уменьшение энтропии за счет возрастания упорядоченности системы. В этом случае следует ожидать неравномерного распределения липидов и расслоения системы. Поскольку основной вклад в энергию взаимодействия липидов в мембранах обусловлен дисперсионным взаимодействием углеводородных цепей, эти эффекты наиболее явно проявляются в мембранах, сформированных из липидов, резко различающихся длиной углеводородных цепей.

Так, в мембранах из ДМФХ (14 углеродных атомов) и ДСФХ (18 углеродных атомов) при любом объемном соотношении компонентов (до 75% ДСФХ) наблюдаются два отдельных фазовых перехода (при 23 и 58°C соответственно), амплитуда которых пропорциональна мольной доле компонентов в мембране. Это означает отсутствие смешивания компонентов в твердой фазе. При $23^\circ\text{C} < T < 58^\circ\text{C}$ система представляет собой двумерный раствор кристаллических доменов ДСФХ в жидкокристаллической матрице из ДМФХ. Ненасыщенные липиды обычно также плохо смешиваются в твердой фазе с насыщенными липидами.

Иную картину можно наблюдать, когда мембраны сформированы целиком из насыщенных липидов, слабо различающихся длиной углеводородных цепей. В таком случае при любом соотношении компонентов равномерное распределение обнаруживается как в «твердом», так и в «жидком» состоянии. Например, в мембранах из ДПФХ (16 углеродных атомов) и ДСФХ регистрируется один фазовый переход, который постепенно смещается от 41 до 58°C при изменении доли ДСФХ в смеси от 0 до 100% соответственно.

В природных мембранах, содержащих большое число различных компонентов, весьма вероятно гетерогенное распределение липидов. Накоплен значительный экспериментальный материал, подтверждающий эту возможность, однако функциональное значение гетерогенного распределения липидов в мембранах является предметом дискуссий.

Липид-белковые взаимодействия. В основе данных взаимодействий лежат межмолекулярные дисперсионные и электростатические силы, водородные связи или другие эффекты связывания. Липид-белковые взаимодействия и обусловленные ими явления условно классифицируют следующим образом: взаимодействия белок — липидный монослой; взаимодействия белок — липидный бислой; липид-белковые взаимодействия в мембранах, включающие липид-зависимые ферменты.

Взаимодействие белков с липидными монослоями обнаруживается при включении в монослой радиоактивно меченных белков (альбумин, цитохром c). Электростатические взаимодействия между белками и монослоем проявляются в виде резкого изменения сорбции белков на заряженных монослоях при отклонении от изоэлектрической точки белков. В опытах с фосфолипазами показано, что электростатические взаимодействия определяют начальные

этапы взаимодействия фермент — липидный монослой. Начальные этапы существенно облегчают последующую правильную стереохимическую ориентацию компонентов фермент-субстратного комплекса.

Взаимодействие белок — липидный бислой — высокоспецифичный и много-стадийный процесс, характеризующийся наряду с поверхностной сорбцией внутримембранным встраиванием белков. Экспериментальным критерием встраивания белков в липидный бислой обычно служит изменение ионной проницаемости мембран. В модельных экспериментах встраивание мембранных белков в искусственные бислойные системы играет решающую роль в их успешной функциональной реконструкции.

Липид-белковое взаимодействие в мембранах проявляется при образовании внутри мембран специфического липидного окружения вокруг белковых молекул. Такие липиды называются связанными или аннулярными (от англ. *annular* — кольцеобразный). В настоящее время, однако, окончательно не решен вопрос о возможности формирования вокруг белков в жидкокристаллических мембранах (при $T > T_{\text{фп}}$) специфического липидного окружения, характеризующегося сравнительно медленным обменом с остальными липидами. Тем не менее с помощью метода ЭПР доказано изменение подвижности и характера упаковки углеводородных цепей под влиянием белков. Более того, методами ЭПР, ЯМР, флуоресценции и другими показано, что пертурбирующее действие различных интегральных и периферических белков (цитохром-с-оксидаза, цитохром с, полилизин, миелин, родопсин, белки тилакоидных мембран и др.) распространяется вплоть до четвертого слоя липидов, окружающих молекулу белка.

Функциональное значение аннулярных липидов обычно интерпретируют, исходя из экспериментальных наблюдений, согласно которым большая активность белков проявляется в менее вязком липидном окружении. Это показано, например, для цитохром-с-оксидазы, встроенной в искусственные липидные мембраны разного состава, или в случае АТФаз в мембранах аукоотрофных микроорганизмов.

В настоящее время описано несколько десятков мембранных ферментов, активность которых зависит от присутствия липидов, ниже перечислены некоторые из них.

Ферментативная активность (функция)	Необходимые липиды
Митохондриальный электронный транспорт	Общие липиды митохондрий
Na^+ , K^+ -АТФаза	Фосфатидилсерин, фосфатидилглицерол
Гликозо-6-фосфатаза Ca^{2+} -АТФаза	Фосфатидилэтаноламин
	Лизофосфатидилхолин, фосфатидилхолин, нейтральные детергенты
Комплекс переносчиков НАД-цитохром-с-редуктазы	Фосфатидилхолин: лизофосфатидилхолин (1:1)
Стеарил-коэнзим-А-десатураза	Фосфолипиды, триглицериды, жирные кислоты
β -Гидроксibuтиратдегидрогеназа	Фосфатидилхолин

Некоторые из них, например митохондриальные электрон-транспортные белки, слабо чувствительны к липидному составу, но эффективно активируются суммарной липидной фракцией, содержащей некоторое количество ненасыщенных липидов. Для достижения максимальной активности других ферментов требуются липиды строго определенного состава. Эти ферменты проявляют специфичность по отношению к полярным головкам липидов и слабо зависят от жирнокислотного состава. В противоположность этому функциональ-

ная активность, например родопсина, зависит от длины углеводородных цепей липидов.

Липидная зависимость активности мембранных ферментов может отчетливо проявляться в условиях селективной экстракции мембранных липидов и при последующем добавлении определенных липидов к делипидизированным мембранам. Так, мягкая эфир-бутанольная экстракция плазматических мембран печени приводит к снижению базальной аденилатциклазной активности и гормон-стимулируемых ответов. Базальная активность полностью восстанавливается при добавлении к мембранам фосфатидилинозитола. Почти полное восстановление гормон-стимулируемой активности наблюдается при добавлении к мембранам фосфатидилсерина. Предполагают, что взаимодействие аденилатциклазы с определенными липидами мембран необходимо для проявления активности каталитического центра и образования активного гормон-рецепторного комплекса (см. гл. XXVI).

Белок-белковые взаимодействия. Эти взаимодействия проявляются в мембранах в виде обратимой внутримембранной агрегации мембранных белков, часто сопровождающейся изменением функциональной и ферментативной активности системы. Так, в мембранах эритроцитов равномерно распределены белковые внутримембранные частицы, обратимо агрегирующие при значениях рН ниже 5,5. Агрегация чувствительна к составу водной фазы; при возрастании концентрации электролитов и низких значениях рН агрегация приостанавливается. Эта внутримембранная агрегация белковых частиц в эритроцитах коррелирует с изменением распределения поверхностных рецепторов.

К настоящему времени выявлено, что циклы агрегации — дезагрегации белков в клеточных мембранах — широко распространенное явление, проявляющееся при пиноцитозе, на ряде стадий клеточного цикла, при взаимодействиях и слиянии мембран и т. д. Полагают, что в основе агрегационных взаимодействий могут лежать силы электростатического характера или более сложные взаимодействия, опосредованные особенностями липидного окружения белков, а также локальная кристаллизация липидов в мембранах.

§ 4. Свободнорадикальное перекисное окисление липидов мембран

Явление перекисного окисления липидов чрезвычайно широко распространено и обнаруживается не только в искусственных, но и природных мембранах. Оно проявляется как при многих патологических процессах и состояниях, так и при некоторых процессах нормальной жизнедеятельности.

В изучении перекисного окисления липидов мембран важную роль сыграли теория перекисного окисления Баха—Энглера (1897), теория цепных разветвленных реакций Семенова (1934), теория жидкофазного окисления углеводов и жиров (Н. М. Эмануэль, 1950—1980), а также гипотеза Б. Н. Тарусова (1954—1957) о решающей роли цепного окисления липидов при действии повреждающих факторов (ионизирующая радиация) на клетку.

Образование свободнорадикальных продуктов за счет диссоциации СН-связи представляет наиболее вероятный путь перекисного окисления углеводов и липидов. Введение ненасыщенных связей в углеводородные молекулы еще более облегчает процесс диссоциации СН-связей, причем наименьшей энергией в этом случае отличается СН-связь, находящаяся в соседнем положении (α -положение) с двойной связью.

Начальным этапом процесса перекисного окисления являются реакции иницирования или катализа, в ходе которых появляются первичные свободные радикалы. В природных мембранных структурах обнаружены ферментные

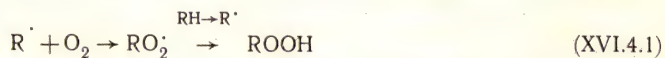
и неферментные системы, способные инициировать реакции перекисного окисления липидов. К числу наиболее изученных ферментных систем перекисного окисления относится НАДФН-зависимая система перекисного окисления, существующая в мембранах микросом печени. Эта система представляет собой цепь переноса электрона с НАДФН на цитохром Р-450, которая в отсутствие субстратов гидроксирования переключается на перекисное окисление полиненасыщенных жирнокислотных остатков липидов собственных мембран.

Широко распространена точка зрения, что в качестве инициирующих факторов в различных мембранных системах могут выступать различные активные формы кислорода (протонированный супероксидный радикал кислорода HO_2 , гидроксильный радикал OH , синглетный кислород $^1\text{O}_2$). Они способны инициировать реакции перекисного окисления как в ходе темновых процессов (например, при фагоцитозе), так и в результате эффектов фотосенсибилизации [фотодинамический эффект, действие ультрафиолетового излучения (см. гл. XXIX), фотоповреждения сетчатки глаза и др.].

Активные формы кислорода достаточно эффективно взаимодействуют с углеводородными цепями липидов. Так, константа скорости реакции отрыва водорода от углеводородных цепей радикалами OH близка к диффузионно контролируемой $\sim 10^9 \div 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Синглетный кислород взаимодействует с полиненасыщенными жирными кислотами с константой скорости $\sim 10^4 \div 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Супероксидный радикал наиболее активен в протонированной форме HO_2 ; кроме того, он может являться предшественником более активных свободных радикалов, например гидроксильного, возникающего, в частности, в катализируемых реакциях типа Хабера — Вайса ($\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH} + \text{OH}^-$). Мощным инициирующим фактором является также ионизирующая радиация, под действием которой возникают разнообразные свободнорадикальные состояния непосредственно в углеводородных цепях, а также образуются активные формы кислорода.

Важную роль в катализе реакций перекисного окисления липидов мембран играют ионы металлов переменной валентности, в частности ионы Fe . В присутствии ряда соединений (АДФ, пирогосфат, аскорбиновая кислота, ЭДТА, некоторые белки) окисление Fe^{2+} сопровождается появлением первичных свободных радикалов липидов или приводит к образованию активных форм кислорода.

Собственно окисление углеводородных цепей мембран происходит в реакции взаимодействия образовавшихся свободнорадикальных интермедиатов (R^\cdot) с кислородом:



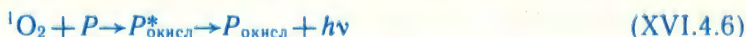
Образование гидроперекиси ROOH обеспечивается здесь за счет отрыва H от субстрата RH и восстановления радикала RO_2^\cdot . Таким образом, в реакции взаимодействия углеводородного радикала с кислородом свободнорадикальный центр R^\cdot не погибает, а образуется вновь из неокисленной молекулы субстрата. Подобные реакции относятся к цепным, а число таких циклов, которое успевает совершить свободнорадикальный центр до момента его гибели, называют длиной цепи или числом оборотов цепи.

В процессе инициирования диссоциации C-H связи или отрыв H в α -положении с образованием неспаренного электрона приводит к перегибридизации соответствующего углеродного атома ($sp^3 \rightarrow sp^2$). Пространственная конфигурация неспаренного электрона в sp^2 гибридизации неотличима от π -электронов двойной связи. В результате π -электроны двойной связи и неспаренный

битора и, как правило, идет с меньшей скоростью (для токоферола $k \sim 10^6 \div 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$). Суммарная константа физического и химического взаимодействия с $^1\text{O}_2$ для гистидина, триптофана порядка $(3 \div 5) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. В фотосинтетических мембранах синглетный кислород образуется в реакции кислорода $^3\text{O}_2$ с мономерными молекулами хлорофилла или бактериохлорофилла P , находящимися в триплетном состоянии:



В результате последующих реакций пигмент окисляется, а в системе возникает хемилюминесценция



за счет рекомбинации радикалов при разложении лабильных перекисей пигментов.

Защитные функции каротиноидов (см. § 5 гл. XXVII) осуществляются по механизму физического тушения.

Перекисное окисление липидов является фактором, способным изменять химический состав и физические параметры, ультраструктурную организацию и функциональные характеристики биологических мембран. Процесс перекисного окисления охватывает главным образом непредельные фосфолипиды биологических мембран, в основном полиненасыщенный фосфатидилэтаноламин. Перекисное окисление приводит к увеличению вязкости мембран за счет уменьшения количества жидких гидрофобных липидов в бислойных участках, появления поперечных межмолекулярных сшивок и возрастания количества упорядоченных липидов, обладающих ограниченной подвижностью в бислое. Происходит также увеличение отрицательного заряда на поверхности мембран, обусловленное появлением вторичных продуктов перекисного окисления липидов, содержащих карбонильные и карбоксильные группы.

В биологических мембранах (мембраны эритроцитов, митохондрий, саркоплазматического и эндоплазматического ретикулума, лизосом) вследствие перекисного окисления липидов индуцируется проницаемость для различных ионов, незлектролитов и макромолекул. Этот эффект потери мембранами барьерных функций лежит в основе патогенеза многих заболеваний.

В результате перекисного окисления липидов происходят изменения свойств таких мембранных белков, как транспортные Ca^{2+} -АТФаза, Na^+/K^+ -АТФаза, цитохромы P -450, b_5 , c , глюкозо-6-фосфатаза, моноаминоксидаза, фосфолипаза, родопсин. В основе модифицирующего действия лежит обеднение микроокружения белков полиеновыми фосфолипидами, образование межмолекулярных сшивок за счет взаимодействия со вторичными продуктами перекисного окисления, окисление SH-групп, снижение термоустойчивости белков.

Обычно схема процесса перекисного окисления липидов мембран строится по типу реакций жидкофазного окисления углеводов:



Здесь RH — молекула углеводорода (жирнокислотный остаток), $R\cdot$ и $RO_2\cdot$ — алкильный и перекисный свободные радикалы, $ROOH$ — гидроперекись, k_0, k_1, \dots — константы соответствующих реакций.

Поскольку реакция 1 протекает с высокой скоростью ($k_1 \simeq 10^7 \div 10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$), а концентрация кислорода в жидкофазных системах обычно достаточно велика, полагают, что в жидкофазных системах выполняется условие $[R\cdot] \ll [RO_2\cdot]$. Значит, в жидкофазных системах важнейшим радикалом является радикал $RO_2\cdot$, только он участвует в процессе продолжения цепи (реакция 2) и вступает в реакции обрыва цепи (реакция 6).

Изменение концентрации радикалов в (XVI.4.7) описывается следующими дифференциальными уравнениями:

$$\begin{aligned} d[R\cdot]/dt &= w_i - k_1[O_2][R\cdot] + k_2[RH][RO_2\cdot]; \\ d[RO_2\cdot]/dt &= k_1[O_2][R\cdot] - k_2[RH][RO_2\cdot] - k_6[RO_2\cdot]^2, \end{aligned} \quad (XVI.4.8)$$

где w_i — суммарная скорость появления радикалов в системе (скорость иницирования).

При стационарных условиях сложение обоих равенств дает

$$w_i = k_6[RO_2\cdot]^2; \quad [RO_2\cdot] = \sqrt{w_i/k_6}. \quad (XVI.4.9)$$

Поскольку субстрат окисления расходуется по реакции 2, скорость окисления w не зависит от концентрации кислорода в системе и может быть представлена в виде

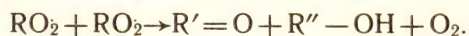
$$w = k_2[RH][RO_2\cdot] = k_2[RH]\sqrt{w_i/k_6}. \quad (XVI.4.10)$$

При добавлении в систему ингибиторов I_nH скорость окисления резко снижается за счет реакции $RO_2\cdot + I_nH \rightarrow ROOH + I_n\cdot$, где $I_n\cdot$ — радикал ингибитора, не способный продолжать цепной процесс.

Хемилюминесценция. В общей последовательности элементарных реакций, описывающих окислительный процесс в углеводородных системах, реакции 4, 5 и 6 отличаются значительным выделением энергии ($\Delta H \sim 294 \div 420$ кДж/моль). Обычно этой энергии достаточно, чтобы продукты реакции оказались в возбужденном состоянии. Последующий переход продуктов из возбужденного состояния в основное может сопровождаться испусканием кванта света, иными словами, окисление углеводов и липидов сопровождается хемилюминесценцией.

Интенсивность хемилюминесценции в реакциях окисления углеводов проявляет резкую зависимость от концентрации кислорода в системе. В отсутствие кислорода интенсивность свечения чрезвычайно низка; при возрастании концентрации кислорода свечение резко усиливается. Специальные эксперименты показали, что эта зависимость обусловлена главным образом тем, что квантовый выход хемилюминесценции в реакции 4 и 5 по крайней мере на два порядка ниже, чем в реакции 6. Таким образом, при достаточных концентрациях кислорода, когда реакция 6 является основной реакцией обрыва цепей, именно она ответственна за хемилюминесценцию.

Обычно в реакции 6 образуются три вида молекулярных продуктов: кетон, спирт и молекула кислорода, т. е.



Вероятность появления этих продуктов в электронно-возбужденном состоянии в первом приближении будет определяться энергией нижнего возбужденного

уровня каждого из этих продуктов. Сравнительно низкими по энергии уровнями возбужденного состояния характеризуются кетоны (триплетный уровень) и кислород (синглетный уровень). Вклад синглетного кислорода (см. ниже) в хемилюминесценцию углеводов обычно невелик, в качестве основного продукта реакции 6, ответственного за хемилюминесценцию, выступает кетон в триплетном состоянии.

Появление кетона в возбужденном состоянии (P^*) в реакции 6 характеризуется квантовым выходом возбуждения $\eta_{\text{возб}}$. Дальнейшая судьба возбужденного состояния определяется отношением вероятностей излучательной и тепловой дезактивации, или квантовым выходом излучения $\eta_{\text{изл}}^P$. В целом интенсивность хемилюминесценции (L) можно охарактеризовать следующим выражением:

$$L = \eta_{\text{возб}} \eta_{\text{изл}}^P k_6 [\text{RO}_2]^2. \quad (\text{XVI.4.11})$$

Обычно значения квантовых выходов $\eta_{\text{возб}}$ и $\eta_{\text{изл}}$ низки, хотя их точные значения, как правило, неизвестны.

Повысить интенсивность хемилюминесценции и обеспечить относительное постоянство квантового выхода излучения удастся путем введения в систему инертных, хорошо люминесцирующих добавок — активаторов (A) хемилюминесценции. Если миграция энергии от возбужденной молекулы (P^*), образующейся в ходе химической реакции, происходит на молекуле активатора достаточно эффективно, то в системе будут протекать следующие процессы: $P^* + A \rightarrow P + A^* \rightarrow P + A + h\nu_A$, где $h\nu_A$ — квант флуоресценции активатора.

При возрастании концентрации активатора в системе интенсивность хемилюминесценции возрастает, приближаясь к некоторому пределу, и смещается в область максимума люминесценции активатора. В пределе интенсивности хемилюминесценции в присутствии активатора (L_A) и без активатора (L_P) будут относиться как квантовые выходы излучения активатора ($\eta_{\text{изл}}^A$) и возбужденного продукта, образующегося в химической реакции ($\eta_{\text{изл}}^P$):

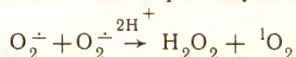
$$L_A/L_P \approx \eta_{\text{изл}}^A/\eta_{\text{изл}}^P. \quad (\text{XVI.4.12})$$

Поскольку квантовый выход излучения продукта ($\eta_{\text{изл}}^P$) обычно лежит в пределах 10^{-4} — 10^{-3} , удачный подбор активатора с высоким квантовым выходом излучения ($\eta_{\text{изл}}^A \simeq 1$) позволяет почти на три порядка повысить интенсивность хемилюминесценции исследуемой реакции.

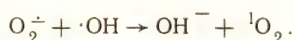
Сам активатор не участвует в химической реакции и не влияет на скорость окислительного процесса, а лишь изменяет интенсивность хемилюминесценции, что определяет чувствительность этого метода.

Рассмотрим хемилюминесцентные реакции, протекающие с участием синглетно возбужденного кислорода. Во многих системах синглетный кислород может возникать в двух состояниях: $^1\Delta g$ и $^1\Sigma_g^+$. Для этого необходима энергия 94,5 и 156,7 кДж/моль соответственно. Состояние $^1\Sigma_g^+$ эффективно тушится водой (время жизни $< 10^{-10}$ с), поэтому в биологических системах учитывают только $^1\Delta g$ -состояние. Время жизни $^1\Delta g$ -состояния в водных растворах также не превышает нескольких микросекунд; при переходе в основное состояние энергия электронного возбуждения главным образом трансформируется в вибрационную энергию молекул растворителя. Возможны также переходы, сопровождающиеся люминесценцией: $^1\Delta g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$; $\lambda = 1270$ нм. Кроме того, излучением сопровождается переход в димерной форме возбужденного кислорода: $[^1\Delta g \cdot ^1\Delta g] \rightarrow ^3\Sigma_g^- + ^3\Sigma_g^-$; $\lambda = 633,5$ нм.

Интенсивность люминесценции мономолекулярной формы $^1\text{O}_2$ чрезвычайно низка. Квантовый выход люминесценции димерной формы, по-видимому, выше. Однако люминесценция димерной формы проявляется при сравнительно высоких концентрациях синглетного кислорода в системе. Отсюда следует, что при жидкофазном окислении углеводов и липидов вклад синглетного кислорода в хемилюминесцентное свечение должен быть чрезвычайно мал. В то же время в процессах, сопряженных с интенсивным генерированием синглетно возбужденного кислорода (фотохимическая генерация, микроволновой разряд, взаимодействие гипохлорит-ионов с пероксидом водорода и др.), наблюдается интенсивная хемилюминесценция, которую связывают с излучающими переходами возбужденного кислорода в основное состояние. Люминесценция, обусловленная возбужденным кислородом, наблюдается также в системах, генерирующих супероксидный анион-радикал кислорода (ксантин — ксантиноксидазная система и др.). Полагают, что возбужденный кислород в этом случае может образовываться в реакциях дисмутации:



или при взаимодействии супероксидного анион-радикала с гидроксильным радикалом (возникает в цикле Габера—Вайса):

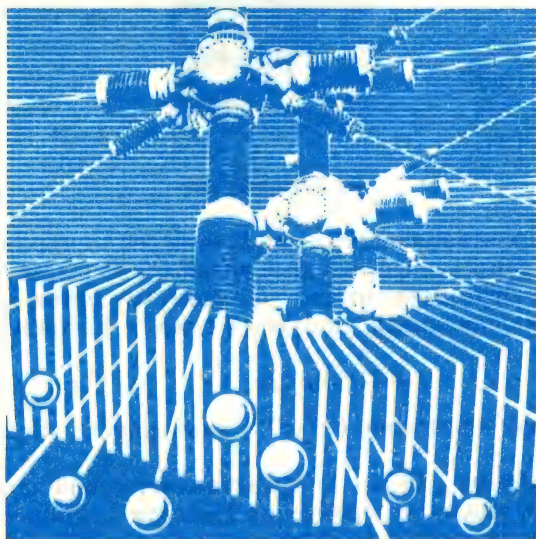


Применение изложенных выше представлений о жидкофазном перекисном окислении липидов оказалось полезным для изучения перекисного окисления в биологических и модельных мембранных системах. Вместе с тем в мембранных системах, где концентрация углеводородных цепей исключительно велика, нельзя полностью пренебрегать радикалами типа $\text{R}\cdot$. Эти радикалы могут быстро перемещаться в углеводородной зоне мембран за счет внутримолекулярной изомеризации и межмолекулярной эстафетной передачи активного центра ($\text{R}\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{RH}\cdot + \text{R}\cdot$). Так как часть этих радикалов может погибать в реакциях рекомбинации, не успев провзаимодействовать с кислородом, то скорость окислительного процесса должна зависеть от концентрации кислорода в системе, что и наблюдается в экспериментах на разнообразных мембранах.

В бислоях природных ненасыщенных мембран двойные связи располагаются преимущественно на глубине 9—10 углеродных атомов, образуя своеобразный слой, в котором эстафетная передача свободных радикалов облегчается. Механизмы эстафетной передачи и внутримолекулярных перегруппировок радикала позволяют также дать объяснение защитному действию антиоксидантов (токоферолы), погруженных лишь своими боковыми цепями в углеводородную зону мембран. Активные группировки (ОН-группы) этих соединений размещаются на наружной поверхности мембраны и разобщены в пространстве с активными свободными радикалами, ведущими окислительный процесс. Полагают, что свободный радикал за счет эстафетной передачи попадает на боковую цепь антиоксиданта. Затем в межмолекулярном комплексе (ненасыщенный жирнокислотный остаток — токоферол) происходит перегруппировка с образованием резонансно стабилизированного, энергетически более выгодного радикала в полярной части молекулы антиоксиданта. Таким образом, антиоксидант выполняет роль своеобразного «канала», по которому свободнорадикальное состояние покидает углеводородную зону мембран. Такие представления носят предварительный характер, однако они отражают назревшую необходимость принимать во внимание свойства мембран как жидкокристаллического тела.

VII

Транспорт веществ и биоэлектрогенез



XVII

Транспорт неэлектролитов

XVIII

Транспорт ионов.
Ионные равновесия

XIX

Электродиффузионная теория
транспорта ионов через мембраны

XX

Ионный транспорт в каналах

XXI

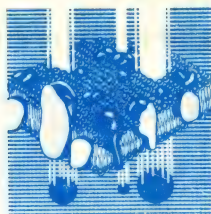
Индукцированный ионный транспорт

XXII

Активный транспорт

XXIII

Транспорт ионов
в возбудимых мембранах



§ 1. Диффузия

Прохождение многих незаряженных веществ через мембраны подчиняется законам диффузии. Процесс диффузии был впервые количественно описан Фиком. Первый закон Фика отражает тот простой факт, что поток вещества (J) в направлении оси x пропорционален движущей силе, т. е. градиенту концентрации dc/dx :

$$J = -Ddc/dx, \quad (\text{XVII.1.1})$$

где D — коэффициент диффузии, $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$; размерность потока — $\text{моль} \cdot \text{см}^{-2} \times \text{с}^{-1}$.

Уравнение диффузии (XVII.1.1) представляет собой частный случай более общего электродиффузионного уравнения Нернста — Планка (см. § 1 гл. XIX) при условии, что транспортируемые частицы не заряжены. Из сопоставления (XVII.1.1) и (XIX.1.2) видно, что $D = RTu$, где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, u — подвижность вещества в рассматриваемой среде.

В случае стационарной диффузии через тонкие мембраны $dc/dx = \text{const}$. Если на краях мембраны толщиной h поддерживаются постоянные концентрации (c'_1 и c'_2), связанные с концентрациями в омывающих растворах (c_1 и c_2) соотношениями $c'_1 = \gamma c_1$ и $c'_2 = \gamma c_2$, где γ — коэффициент распределения, то поток равен

$$J = -Ddc/dx = D(c_2 - c_1)\gamma/h = P(c_2 - c_1). \quad (\text{XVII.1.2})$$

Здесь $P = D\gamma/h = uRT\gamma/h$ — проницаемость мембраны для данного вещества, $\text{см} \cdot \text{с}^{-1}$; коэффициент γ отражает липофильность вещества; u — подвижность вещества в мембране.

В общем случае нестационарной диффузии концентрация вещества в любой точке по оси x изменяется во времени. Рассмотрим подробнее одномерную диффузию вещества в направлении оси x (рис. XVII.1). Представим элементарный объем с площадью $S = 1 \text{ см}^2$ и толщиной dx . Предположим, что в точке x поток равен J , а в точке $(x + dx)$ поток равен $J + (\partial J/\partial x)dx$, где $\partial J/\partial x$ — градиент потока в направлении оси x . Количество вещества, накапливающегося в рассматриваемом объеме за единицу времени, равно — $(\partial J/\partial x)dx$. Количество вещества, накапливающегося в элементарном объеме, можно выразить как результат изменения концентраций во времени $\partial c/\partial t$, умноженной на объем $V = Sdx$. Приравнявая эти два разных выражения, описывающие накопление вещества в объеме, получаем так называемое уравнение непрерывности

$$-\partial J/\partial x = \partial c/\partial t. \quad (\text{XVII.1.3})$$

Подставляя (XVII.1.1) в (XVII.1.3), получаем выражение для второго закона Фика:

$$\partial c/\partial t = D\partial^2 c/\partial x^2. \quad (\text{XVII.1.4})$$

Уравнение (XVII.1.4) описывает изменение концентрации растворенного вещества в зависимости от координаты x и времени. Методом подстановки можно убедиться в том, что решение дифференциального уравнения (XVII.1.4) имеет вид

$$c = \frac{c_0}{2(\pi Dt)^{1/2}} e^{-x^2/(4Dt)}. \quad (\text{XVII.1.5})$$

В этом уравнении c_0 — общее количество вещества, нанесенное в начальный момент времени $t=0$ в точке $x=0$, а c — концентрация в точке x в любой момент времени t . Профили концентрации вещества по координате x для двух различных моментов времени, описываемые уравнением (XVII.1.5), приведены на рис. XVII.2. Для выпуклых участков кривой $\partial^2 c / \partial x^2 < 0$ и, по уравнению (XVII.1.4), $\partial c / \partial t < 0$, т. е. концентрация вещества уменьшается во времени. На удаленных от центра участках кривой $\partial^2 c / \partial x^2 > 0$. Следовательно, $\partial c / \partial t > 0$, т. е. концентрация вещества в этих участках во времени повышается. Полученный результат отражает известный факт, что диффузия всегда направлена на выравнивание концентрационных градиентов.

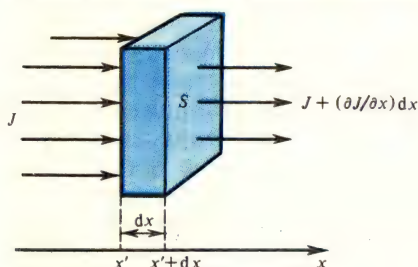


Рис. XVII.1. Градиент потока J в случае одномерной диффузии через элементарный объем с площадью S и толщиной dx

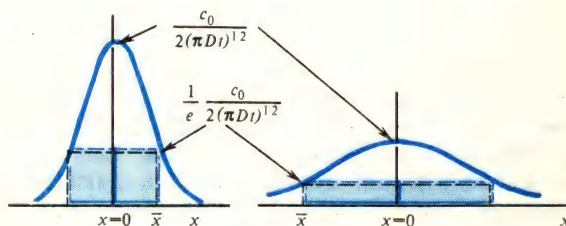


Рис. XVII.2. Профили концентрации диффундирующего вещества для двух моментов времени (t)

Профиль концентрации, достигаемый к моменту времени t (см. рис. XVII.2), характеризуется параметром x . Концентрация вещества на расстоянии x уменьшается в e раз по сравнению с концентрацией в начальной точке, если показатель экспоненты в уравнении (XVII.1.5) равен единице [$\bar{x}^2/(4Dt) = 1$]. Следовательно,

$$\bar{x}^2 = 4Dt. \quad (\text{XVII.1.6})$$

Формула (XVII.1.6) характеризует важное свойство процесса диффузии: время, необходимое для диффузии, увеличивается пропорционально квадрату расстояния.

Коэффициент диффузии определяется размером и формой молекул. Для малых молекул в воде $D \sim 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Для сферических частиц, диффундирующих в жидкости, применимо уравнение Стокса — Эйнштейна, связывающее коэффициент диффузии с радиусом частиц (r) и вязкостью среды (η):

$$D = k_B T / (6\pi r \eta). \quad (\text{XVII.1.7})$$

Предполагая, что молекулярная масса вещества (M) пропорциональна объему сферических молекул ($M \sim 4/3 \pi r^3$), при постоянных η и T получаем соотношение

$$DM^{1/3} = \text{const} \quad \text{или} \quad \lg D + \frac{1}{3} \lg M = \text{const}. \quad (\text{XVII.1.8})$$

Графически зависимость (XVII.1.8) между $\lg D$ и $\lg M$ изображается прямой с угловым коэффициентом $-0,33$, что было получено в случае диффузии в воде крупных белковых молекул, обладающих почти сферической формой (молекулы рибонуклеазы). Для малых молекул, от водорода до трисахаридов, эксперимент дает более крутую прямую

$$DM^{1/2} = \text{const.} \quad (\text{XVII.1.9})$$

Это отклонение обусловлено тем, что молекулы малых размеров нельзя рассматривать как сферические. Кроме того, уравнение (XVII.1.7) относится к частицам, диффундирующим в идеальной гомогенной жидкости. Для малых молекул, сравнимых по размерам с молекулами воды, это условие, очевидно, не соблюдается.

Многочисленные исследования диффузии веществ через биологические мембраны выявили корреляцию между проникающей способностью веществ и их растворимостью в липидах. В связи с этим долгое время полагали, что молекулы проникают через липидную часть мембраны благодаря своей способности растворяться в липидах. Однако малые гидрофильные молекулы могут проникать через поры в мембране (см. § 1 гл XVI).

Для проникновения неэлектролитов из воды в гидрофобную часть мембраны или узкую мембранную пору необходима частичная или полная дегидратация молекул, т. е. затраты энергии на преодоление взаимодействий полярных групп молекулы ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) с диполями воды. Например, значения энергии активации, полученные для проникновения этиленгликоля, глицерина и эритрита через искусственные фосфолипидные мембраны, а также через мембраны изолированных клеток, близки к значениям энергии дегидратации этих соединений. Необходимость дегидратации молекул является причиной сильной температурной зависимости коэффициента проницаемости мембран для ряда неэлектролитов. Хотя через биологические мембраны диффундируют самые разные соединения, в то же время даже сравнительно небольшие молекулы аминокислот и моносахаридов практически не проникают через мембраны большинства клеток за счет простой диффузии.

§ 2. Облегченная диффузия

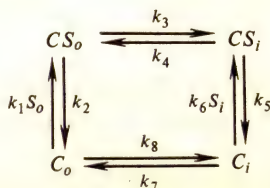
Пассивный транспорт веществ при участии переносчиков характеризуется некоторыми чертами, отличающими его от простой диффузии.

1. Высокая специфичность, которая связана со способностью переносчиков различать близкие по структуре соединения (например, L- и D-изомеры сахаров и аминокислот).

2. С ростом концентрации субстрата скорость транспорта увеличивается только до некоторой предельной величины (насыщение).

3. Наблюдается чувствительность к низким концентрациям ингибиторов, взаимодействующих с переносчиками.

Механизм транспорта с участием переносчика можно представить в виде следующей кинетической схемы:



В этой схеме c_o и c_i — переносчики в свободном состоянии на наружной и внутренней сторонах мембраны, а cs_o и cs_i — переносчики, связанные с субстратом; s_o и s_i — концентрации субстрата в наружном и внутреннем растворах соответственно, а $k_1—k_8$ — константы скоростей отдельных стадий. Выражение для скорости потока субстрата можно получить, решая систему уравнений, описывающих стационарное состояние, при $dc_o/dt = d[cs_o]/dt = d[cs_i]/dt = dc_o/dt = 0$. Отсюда следует, что поток субстрата J равен

$$J = k_1 c_o s_o - k_2 [cs_o] = k_3 [cs_o] - k_4 [cs_i] = k_5 [cs_i] - k_6 c_i s_i = k_7 c_i - k_8 c_o. \quad (\text{XVII.2.1})$$

Поскольку суммарная концентрация переносчика c_t неизменна, можно записать

$$c_t = c_o + cs_o + c_i + cs_i. \quad (\text{XVII.2.2})$$

Решение приведенной системы уравнений (XVII.2.1); (XVII.2.2) в общем виде включает различные комбинации констант от k_1 до k_8 , а также концентрации субстрата по обеим сторонам мембраны s_o и s_i . Начальная скорость переноса вещества, когда $s_i = 0$, описывается выражением, аналогичным уравнению Михаэлиса—Ментен

$$J = J_{\max} s_o / (K_m + s_o). \quad (\text{XVII.2.3})$$

При очень низкой концентрации субстрата s_o уравнение (XVII.2.3) сводится к формуле для случая простой диффузии (линейная зависимость от концентрации s_o). Константа K_m численно равна концентрации субстрата, при которой $J = J_{\max}/2$, и является важным параметром, характеризующим скорость всего процесса. В реальной системе общий поток через мембрану всегда включает компонент, обусловленный простой диффузией (рис. XVII.3).

Специфические ингибиторы транспортных систем имеют структурное сходство с транспортируемыми молекулами. Например, флоридзин конкурентно ингибирует транспорт глюкозы в некоторые клетки, не проникая при этом через клеточную мембрану. В роли конкурентных ингибиторов транспорта сахаров, например D-глюкозы, могут выступать близкие по структуре сахара, например D-галактоза, способные транспортироваться через мембрану.

Существуют переносчики, обладающие двумя центрами связывания субстрата. В этом случае транспорт одного вещества через мембрану часто зависит от присутствия другого вещества. Примером такой системы транспорта служит совместный перенос в одном направлении (симпорт) некоторых аминокислот и Na^+ в эритроцитах и в эпителиальных клетках кишечника.

Движущей силой транспорта с участием переносчика является градиент химического или электрохимического потенциала вещества. Функционирование систем с облегченной диффузией, так же как и простой диффузии, направлено на выравнивание градиентов и установление равновесия в системе. Однако градиенты вещества могут поддерживаться длительное время за счет того, что проникающие молекулы потребляются или образуются в ходе биохимических реакций по одну из сторон мембраны.

Ткани животных обладают системами облегченной диффузии для ряда ме-

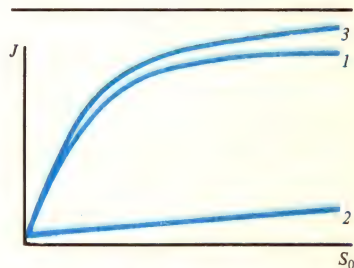


Рис. XVII.3. Зависимость начальной скорости (J) поступления вещества внутрь клеток от концентрации в наружной среде (S_o):

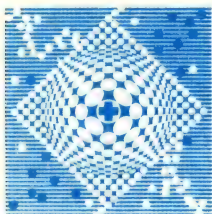
1 — транспорт с участием переносчика, 2 — простая диффузия, 3 — суммарная скорость переноса

таболитов, которые они получают из плазмы крови, например для сахаров, аминокислот, пуринов и глицерина.

Некоторые транспортные процессы, имеющие решающее значение для организма, протекают не только при участии переносчиков, но и с затратами энергии метаболизма, поддерживающими градиенты. Это позволяет транспортировать вещества против градиентов концентрации или электрохимического потенциала. Такие процессы называют активным транспортом (см. § 3, гл. V). Основное отличие активного транспорта от облегченной диффузии заключается в том, что одна из стадий активного транспорта является энергозависимой. Когда для переноса вещества используется энергия АТФ или окислительно-восстановительных реакций, транспорт называют первично-активным. Если же в качестве источника энергии используется градиент концентрации ионов, то транспорт называют вторично-активным. В отличие от предыдущего вида транспорта энергозависимая стадия этого процесса представляет собой антипорт или симпорт веществ с ионами. Более подробно системы активного транспорта рассмотрены в гл. XXVI.

Глава XVIII

Транспорт ионов, Ионные равновесия



Существует несколько возможных механизмов прохождения ионов через мембрану: 1) растворение иона в липидной фазе мембраны, диффузия и последующий переход из мембраны в раствор; 2) движение по ионным каналам, являющимся структурными компонентами мембран; 3) транспорт с участием переносчиков. Эти механизмы переноса установлены как для биологических мембран, так и для бислойных липидных мембран. Отдельную категорию составляет транспорт через мембранные барьеры клетки по механизму пиноцитоза.

Скорость проникновения ионов через мембрану определяется такими ее свойствами, как толщина, значение диэлектрической проницаемости, наличие фиксированных электрических зарядов на ее поверхности, знак и плотность расположения этих фиксированных зарядов на мембране, размеры и число пор в мембране, наличие фиксированных зарядов в порах, и некоторыми другими. В данном разделе рассмотрены движущие силы пассивного транспорта ионов и ионные равновесия в мембранных системах.

§ 1. Электрохимический потенциал

Движущей силой диффузии служит разность химических потенциалов данного вещества в двух областях, между которыми происходит диффузия. Химический потенциал растворенного вещества (μ) для условий, при которых вкладом гидростатического давления можно пренебречь, равен [см. (V.2.13)]

$$\mu = \mu_0 + RT \ln c, \quad (\text{XVIII.1.1})$$

где μ_0 — стандартный химический потенциал, зависящий от природы растворителя, а c — концентрация. При больших значениях концентраций c в (XVIII.1.1) заменяется активностью. Для ионов, движение которых зависит не только от концентрации, но и от электрического потенциала, соответствующим понятием является электрохимический потенциал [см. (V.3.12)]. Электрохимический потенциал $\bar{\mu}$ иона типа i для условий, при которых активность иона равна его концентрации, а вклад гидростатического давления пренебрежимо мал, равен

$$\bar{\mu} = \mu_0 + RT \ln c + zF\varphi, \quad (\text{XVIII.1.2})$$

где φ — электрический потенциал; z — валентность; T — абсолютная температура, К; R — газовая постоянная, равная примерно $8,31 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$; F — число Фарадея ($9,65 \cdot 10^4 \text{ Кл/моль}$). Электрохимический потенциал — мера работы, необходимой для переноса 1 моля (1 грамм-эквивалент) ионов из раствора с данной концентрацией и данным электрическим потенциалом в бесконечно удаленную точку в вакууме. Эта работа складывается из затрат на преодоление сил химического взаимодействия ($\mu_0 + RT \ln c$) и работы по переносу зарядов в электрическом поле ($zF\varphi$). Иногда работу по переносу ионов относят не к грамм-эквиваленту, а к одному иону. В этом случае в правую часть

уравнения (XVIII.1.2) вместо констант R и F , относящихся к 1 молю ионов, входят постоянная Больцмана ($k_B = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж·К⁻¹) и заряд электрона ($e = 1,6 \cdot 10^{-19}$ Кл).

$$\bar{\mu} = \mu_0 + k_B T \ln c + ze\varphi. \quad (\text{XVIII.1.3})$$

Независимо от выбора определений (XVIII.1.2) или (XVIII.1.3) формулы, описывающие распределение потенциала и концентраций в равновесных и неравновесных системах, получаются эквивалентными, так как входящие в них отношения RT/F и $k_B T/e$ равны и составляют при температуре 20 °С примерно 25 мВ.

Пассивное движение ионов происходит из области с высоким электрохимическим потенциалом в область с более низким электрохимическим потенциалом. Движущей силой переноса ионов является градиент электрохимического потенциала $d\bar{\mu}/dx$.

§ 2. Гидратация ионов

Взаимодействие иона с молекулами растворителя определяет значение стандартного химического потенциала μ_0 . В воде гидратация ионов приводит к изменению их эффективного радиуса. Радиус гидратированных ионов обычно оценивают с помощью соотношения Стокса — Эйнштейна [см. (XVII.1.7)]:

$$r = k_B T / (6\pi D \eta). \quad (\text{XVIII.2.1})$$

При температуре 25 °С радиус в нанометрах равен $0,245 \cdot 10^{-5}/D$, где D выражается в см²·с⁻¹. Рассчитанный таким способом радиус Na⁺ равен 0,184 нм. Это значение в два раза больше ван-дер-ваальсова радиуса (см. § 1 гл. VIII), измеренного по дифракции рентгеновских лучей на кристаллах, и вызвано наличием вокруг иона молекул воды.

Применение соотношения (XVIII.2.1) к частицам атомных размеров ограничено, поскольку при размере диффундирующих частиц, близком к размеру воды, среду нельзя рассматривать как однородную. Кроме того, диффундирующая частица влияет на локальную структуру воды, в результате чего эффективная локальная вязкость может отличаться от макроскопической вязкости.

Зависимость от радиуса коэффициентов диффузии различных неэлектролитов (H₂, O₂, He, Ne, Ar, H₂S), мало изменяющих структуру воды, согласуется с уравнением Стокса — Эйнштейна. В соответствии с теорией малые частицы оказываются подвижнее больших. Однако зависимость подвижности ионов в воде от радиуса максимальна при 0,15 нм для одновалентных катионов и при 0,2 нм для одновалентных анионов (рис. XVIII.1).

Все ионы щелочных металлов располагаются слева от максимума. Это отражает известную аномалию — ионы металлов с большим порядковым номером диффундируют быстрее, чем ионы с меньшим порядковым номером. Обратную пропорциональность между радиусом иона и трением при диффузии можно объяснить, не привлекая представления об увеличении радиуса при гидратации малых ионов.

Согласно современной теории, на движущийся ион действует не только гидродинамическая сила трения, пропорциональная радиусу, но и так называемая диэлектрическая сила трения. Гидродинамическая сила трения (F), действующая на сферические частицы, движущиеся в жидкости со скоростью v , описывается законом Стокса:

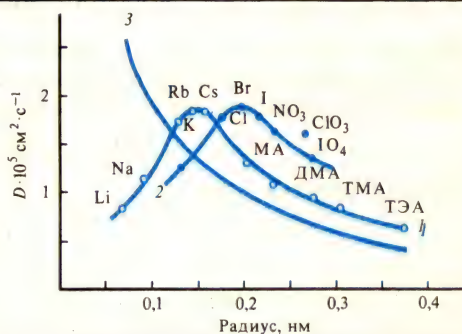
$$F = 6\pi\eta r v. \quad (\text{XVIII.2.2})$$

Эта сила пропорциональна радиусу частицы и не зависит от заряда. В отличие от нее диэлектрическая сила трения пропорциональна квадрату заряда и обратно пропорциональна кубу ионного радиуса. Результирующая этих двух сил имеет минимум при радиусе порядка 0,2 нм. Наличие диэлектрической силы трения объясняет и малую подвижность многовалентных ионов.

Происхождение диэлектрического трения можно представить, рассмотрев однородный диэлектрик, обтекающий заряженную сферу. Диэлектрик поляризуется при приближении к заряду и теряет поляризацию при удалении от него.

Рис. XVIII.1. Зависимость коэффициентов свободной диффузии (D) одновалентных катионов и анионов от кристаллографического радиуса иона (1, 2); кривая 3 изображает теоретическую зависимость, описываемую уравнением Стокса—Эйнштейна:

MA — метиламмоний, DMA — диметиламмоний, TMA — триметиламмоний, ТЭА — тетраэтиламмоний



Если бы изменение поляризации происходило так же быстро, как изменение электрического поля при приближении или удалении заряда, то поляризация была бы сферически симметричной и не создавала суммарной силы, действующей на ион. Однако в реальных диэлектриках одна из составляющих вектора поляризации релаксирует достаточно медленно (для воды время релаксации $\sim 10^{-11}$ с). Из-за этого запаздывания поляризация среды, приближающейся к заряженной сфере, оказывается меньше, чем поляризация удаляющейся среды, где поляризация уже завершилась. Поляризация не является сферически симметричной, и движение иона тормозится тем больше, чем быстрее он движется.

Энергия гидратации щелочных ионов Cs, K, Na лежит в пределах от —280 до —400 кДж/моль, т. е. приближается к энергии СН-связи в углеводородах. По сравнению с энергией тепловых колебаний ($RT \sim 2,5$ кДж/моль) энергия гидратации громадна. Поэтому дегидратация любого иона щелочных металлов является энергетически невыгодной. Энергия гидратации равна энергии поляризации диэлектрика сильным локальным полем иона. Чем выше значение диэлектрической проницаемости среды, тем сильнее поляризация и более стабилен ион. По теории Борна, электрическая свободная энергия переноса моля ионов из одного диэлектрика с диэлектрической проницаемостью ϵ_1 в другой с диэлектрической проницаемостью ϵ_2 равна

$$\Delta\mu_0 = \Delta W = (zF)^2/2r \left[(1/\epsilon_2 - 1/\epsilon_1) \right]. \quad (\text{XVIII.2.3})$$

Для практических расчетов множитель $z^2 F^2/(2r)$ равен $69,5 z^2/r$, если ΔW выражается в килоджоулях на моль, а радиус иона — в нанометрах.

Рассчитанные по теории значения свободной энергии для перехода ионов Cs, K и Na из вакуума в воду составляют примерно —412, —517 и —727 кДж/моль соответственно, что превышает экспериментальные значения. Электрические поля вблизи ионов настолько велики (10^6 — 10^7 В/см), что ближайšie к иону молекулы воды ориентированы практически полностью. Такое состояние называют диэлектрическим насыщением. Упорядоченность воды в гидратной

оболочке является более полной вблизи меньших по размеру ионов, которые создают наиболее интенсивные локальные электрические поля. Как только упорядоченность становится полной, дальнейшая поляризация делается невозможной. Это эквивалентно понижению эффективной диэлектрической проницаемости, и общая энергия поляризации в реальных системах оказывается меньше, чем в случае идеально поляризуемого диэлектрика.

§ 3. Ионное равновесие на границе раздела фаз

Ионное равновесие между двумя водными растворами, разделенными мембраной, описывается наиболее просто. В случае равновесия по ионам одного типа электрохимические потенциалы иона в обоих растворах одинаковы:

$$RT \ln c_1 + zF\varphi_1 = RT \ln c_2 + zF\varphi_2,$$

откуда [см. (V.3.13)]

$$\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_1}{c_2}. \quad (\text{XVIII.3.1})$$

Уравнение Нернста (XVIII.3.1) показывает, что в условиях электрохимического равновесия разность потенциалов на мембране определяется соотношением концентраций данного иона в двух соприкасающихся растворах. После перехода в (XVIII.3.1) к десятичным логарифмам и подстановке $2,3RT/F \approx \approx 58$ мВ (при температуре 20 °C) уравнение Нернста для одновалентных ионов принимает вид

$$\Delta\varphi = 58 \lg (c_1/c_2). \quad (\text{XVIII.3.2})$$

В биологических системах распределение K^+ между цитоплазмой животных клеток и средой достаточно хорошо соответствует уравнению Нернста. Однако распределение Na^+ в большинстве клеток резко отличается от равновесного.

Рассмотрим ионное равновесие на границе вода — неполярный растворитель. Такая система может рассматриваться как модель границы раздела вода — липидная мембрана с диэлектрической проницаемостью 2—3.

Представим систему из двух несмешивающихся жидкостей, например масло — вода, в которой растворен электролит A^+B^- . Вследствие неодинаковой липофильности ионов A^+ и B^- между объемами фаз возникает так называемая межфазная разность потенциалов.

На рис. XVIII.2 схематично показаны профили равновесного распределения концентраций A^+ и B^- и профиль электрического потенциала вблизи поверхности раздела двух фаз с различными диэлектрическими проницаемостями ($\epsilon_1 > \epsilon_2$) для случая, когда растворимость анионов в неполярной среде выше, чем растворимость катионов. Плоскость $x=0$ соответствует границе раздела фаз, слева от которой находится среда с диэлектрической постоянной ϵ_1 , а справа — с диэлектрической постоянной ϵ_2 . Если анионы обладают большей липофильностью, то общее их содержание в органической фазе несколько превышает содержание катионов, вследствие чего неполярная органическая фаза несет избыточный отрицательный заряд и имеет более низкий потенциал, чем водная фаза. Избыток ионов одного знака в каждой из соприкасающихся фаз настолько мал, что не может быть обнаружен современными аналитическими методами. В областях, далеких от поверхности раздела, концентрации катионов и анионов одинаковы, т. е. соблюдается условие электронейтральности объемов фаз $c_A = c_B$. Электрический потенциал в объеме фаз постоянен и принимает значения φ_1 и φ_2 в водной фазе и органическом растворителе соответ-

ственно. Концентрация ионов в фазе с низкой диэлектрической проницаемостью ϵ_2 ниже, чем концентрация в водной фазе c_1 , поскольку переход заряженных частиц из фазы с высоким ϵ в фазу с низким значением диэлектрической проницаемости связан с повышением электростатической энергии заряженной частицы.

Вблизи поверхности раздела, справа и слева от границы, расположены диффузные слои (см. рис. XVIII.2), в каждом из которых концентрации катионов и анионов неодинаковы. Условие электронейтральности для этих областей не выполняется: в одной из фаз содержится небольшой избыток отрицательных

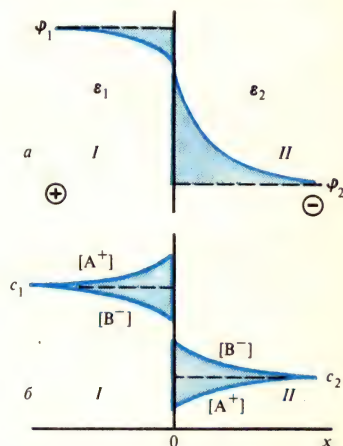


Рис. XVIII.2. Профили распределения потенциала и концентрации ионов (A^+ и B^-) на границе раздела фаз (I и II):

I — водный раствор ($\epsilon_1 = 80$), II — масло ($\epsilon_2 = 2 \div 3$); а — распределение потенциала (ϕ), б — распределение концентраций (c) катионов и анионов; c_1 , c_2 — концентрации электролитов в объеме фаз I и II; графики относятся к случаю, когда анионы лучше растворимы в неполярной фазе, чем катионы

зарядов, а в другой — положительных. В этой области потенциал не постоянен, а зависит от пространственной координаты x . Таким образом, потенциал на границе раздела двух фаз меняется не скачком, а постепенно на некотором расстоянии от границы.

Формулы, описывающие разность электрических потенциалов и распределение концентраций между объемами фаз, могут быть получены из условия электрохимического равновесия в системе. При равновесии электрохимический потенциал для каждого из ионов одинаков в любой точке системы (не зависит от координаты x). В связи с этим $\mu_A^{(1)} = \mu_A^{(2)}$ и $\mu_B^{(1)} = \mu_B^{(2)}$, т. е.

$$\begin{aligned} \mu_{0A}^{(1)} + RT \ln c_1^A + F\phi_1 &= \mu_{0A}^{(2)} + RT \ln c_2^A + F\phi_2 \quad (z = +1); \\ \mu_{0B}^{(1)} + RT \ln c_1^B - F\phi_1 &= \mu_{0B}^{(2)} + RT \ln c_2^B - F\phi_2 \quad (z = -1), \end{aligned} \quad (\text{XVIII.3.3})$$

где индексы 1 и 2 относятся к первой и второй фазе, а индексы А и В — к катиону A^+ и аниону B^- . Уравнения (XVIII.3.3) после перегруппировки имеют вид

$$\begin{aligned} -F\Delta\phi &= -\Delta\mu_{0B} + RT \ln(c_2^B/c_1^B), \\ F\Delta\phi &= -\Delta\mu_{0A} + RT \ln(c_2^A/c_1^A); \end{aligned} \quad (\text{XVIII.3.4})$$

где $\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2$; $\Delta\mu_{0A} = \mu_{0A}^{(1)} - \mu_{0A}^{(2)}$. В объеме фаз концентрации катионов и анионов одинаковы: $c_1^A = c_1^B = c_1$ и $c_2^A = c_2^B = c_2$. Решая уравнения относительно c_2/c_1 или $\Delta\phi$, получаем формулы, отражающие зависимости разности потенциалов между объемами фаз и распределения ионов между объемами фаз от стандартных химических потенциалов ионов A^+ и B^- в водной и органической средах:

$$\ln(c_2/c_1) = (\Delta\mu_{0A} + \Delta\mu_{0B})/(2RT); \quad \Delta\phi = (\Delta\mu_{0B} - \Delta\mu_{0A})/(2F). \quad (\text{XVIII.3.5})$$

Соотношения (XVIII.3.5) становятся более наглядными, если выразить разность стандартных химических потенциалов для каждого иона ($\Delta\mu_0$) через межфазный коэффициент распределения (γ), который, по определению, равен отношению концентраций иона в соприкасающихся фазах у самой границы раздела:

$$\gamma = c_0^{(2)}/c_0^{(1)}. \quad (\text{XVIII.3.6})$$

В этой формуле $c_0^{(1)}$ и $c_0^{(2)}$ обозначают концентрации иона у самой границы раздела (плоскость $x=0$) слева и справа от границы соответственно.

Для того чтобы выразить $\Delta\mu_0$ через коэффициенты распределения, запишем условие равновесия для границы раздела фаз:

$$\mu_{0A}^{(1)} + RT \ln c_{0A}^{(1)} = \mu_{0A}^{(2)} + RT \ln c_{0A}^{(2)}. \quad (\text{XVIII.3.7})$$

Члены $F\phi$ в левой и правой частях этого уравнения отсутствуют, поскольку электрический потенциал на границе фаз непрерывен и значения $\phi_0^{(1)}$ и $\phi_0^{(2)}$ вблизи плоскости $x=0$ одинаковы. Учитывая, что $c_0^{(2)}/c_0^{(1)} = \gamma$, получим из (XVIII.3.7)

$$\ln \gamma_A = \Delta\mu_{0A}/(RT) \quad \text{и} \quad \ln \gamma_B = \Delta\mu_{0B}/(RT). \quad (\text{XVIII.3.8})$$

Возвращаясь к уравнениям (XVIII.3.5), может выразить межфазную разность потенциалов и соотношение концентраций электролита в двух фазах в виде

$$\ln(c_2/c_1) = \frac{1}{2}(\ln \gamma_A + \ln \gamma_B) \quad \text{или} \quad c_2/c_1 = \sqrt{\gamma_A \gamma_B}; \quad (\text{XVIII.3.9})$$

$$\Delta\phi = RT/2F [\ln(\gamma_B/\gamma_A)]. \quad (\text{XVIII.3.10})$$

Как следует из уравнения (XVIII.3.10), межфазный скачок потенциала возникает только в том случае, когда коэффициенты распределения катионов и анионов различны. При одинаковых коэффициентах межфазная разность потенциалов равна нулю.

Коэффициент распределения иона можно в первом приближении оценить из уравнения (XVIII.3.8), показывающего, что коэффициент связан экспоненциальной зависимостью с работой по переносу иона из водной фазы 1 в неполярную фазу 2. Эта работа равна энергии дегидратации иона и может быть оценена по формуле Борна [см. (XVIII.2.3)]. Если принять, что радиус иона равен 0,2 нм, а диэлектрическая постоянная мембраны $\epsilon = 3$, то коэффициент распределения окажется равным 10^{-20} . В таком случае проводимость бислойных липидных мембран была бы существенно ниже реально измеряемых значений ($\sim 10^{-8} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ для немодифицированных мембран).

Расхождение расчетных и экспериментальных значений мембранной проводимости указывает, что энергия ионов в тонких липидных и биологических мембранах должна быть несколько ниже, чем следует из формулы Борна. Такое понижение электростатической энергии иона в мембране может быть обусловлено рядом причин. Прежде всего электростатическая энергия иона при переходе его из водной фазы в органический растворитель меняется не скачком, а постепенно на некотором расстоянии справа и слева от границы раздела (рис. XVIII.3). Расчеты по приведенной в подписи к рис. XVIII.3 формуле показывают, что основное изменение свободной энергии иона по координате x происходит на расстоянии порядка ионного радиуса от границы раздела. В связи с этим энергия иона в тонкой мембране, сравнимой по толщине с размерами ионов, несколько ниже, чем энергия иона в сплошной среде (рис. XVIII.3, III), т. е. энергетический барьер для прохождения ионов через мембрану понижен. Однако для клеточных и бислойных липидных мембран, имеющих толщину 7,0—10,0 нм, понижение энергетического барьера (ΔW , см. рис. XVIII.3, III) составляет не более 5%

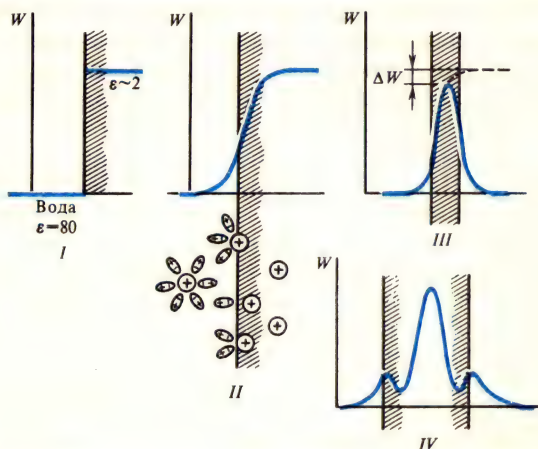
и такой небольшой сдвиг можно не учитывать при оценке коэффициентов распределения.

Существенное снижение энергии иона в мембране может быть обусловлено следующими факторами: 1. Ионы могут образовывать ионные пары внутри мембраны. 2. Мембрана может содержать поры с высокой диэлектрической постоянной, проход через которые требует более низкой энергии активации, чем переход иона из раствора в липид. 3. Ион может быть «завернут» в нейтральную молекулу «переносчика» с высокой поляризуемостью, которая сольватирует его

Рис. XVIII.3. Профили свободной энергии иона на границе несмешивающихся жидкостей и в мембранах. I — без учета краевых эффектов; II — на малых расстояниях вблизи границы раздела; III — в тонкой незаряженной мембране; IV — в мембране с фиксированными зарядами;

$$W = [\epsilon / (8\pi)] \int_a^\infty E^2 dV,$$

где W — энергия иона, E — напряженность поля, dV — элементарный объем, ϵ — диэлектрическая проницаемость, a — радиус иона



(увеличивает эффективный радиус r), чем способствует растворению его в мембране.

Следует отметить приближенный характер оценок коэффициентов распределения по формуле Борна. Такие оценки неприменимы в отношении жирорастворимых ионов, высокое сродство которых к липидной фазе обусловлено спецификой их химической структуры. Кроме того, при использовании формулы Борна не учитывается наличие на поверхности мембран заряженных групп полярных головок фосфолипидов (см. § 1 гл. XV). Наличие фиксированных отрицательных зарядов способствует адсорбции катионов и существенно сказывается на концентрации ионов в мембране.

Взаимодействие ионов с фиксированными зарядами мембраны приводит также к изменению профиля энергии иона в мембране. Для однородной незаряженной мембраны (см. рис. XVIII.3, III) существует один барьер, величина которого отражает работу по переносу заряженной частицы внутрь слоя с низкой диэлектрической проницаемостью. Для фосфолипидных мембран, имеющих на поверхностях фиксированные заряды, в энергетическом профиле возникают дополнительные барьеры на краях мембраны, соответствующие энергии активации адсорбции — десорбции иона в участках с фиксированными зарядами (см. рис. XVIII.3, IV).

§ 4. Профили потенциала и концентраций у границы раздела фаз

Уравнения (XVIII.3.9) и (XVIII.3.10) относятся к скачку потенциала и соотношению концентраций между объемами фаз. Распределение концентраций ионов в двойном слое вблизи границы раздела определяется статистическим уравне-

нием Больцмана, которое может быть получено из условия равенства электрохимического потенциала в любой точке по оси x (см. рис. XVIII.2). Для произвольно взятой плоскости x в фазе 1 имеем (полагая $\mu_x = \mu_0$)

$$RT \ln c_x + zF\varphi_x = RT \ln c_0 + zF\varphi_0,$$

где c_x , φ_x — концентрация иона и электрический потенциал на расстоянии x ; c_0 , φ_0 — концентрация и потенциал в объеме фазы 1. Отсюда следует, что

$$c_x = c_0 e^{-zF\varphi/(RT)}, \quad (\text{XVIII.4.1})$$

где $\varphi = \varphi_x - \varphi_0$ — потенциал в плоскости x , отсчитанный от уровня потенциала в объеме раствора. Уравнение (XVIII.4.1) показывает, что по мере приближения к отрицательно заряженной фазе (см. рис. XVIII.2) локальная концентрация катионов возрастает, а локальная концентрация анионов снижается. Десятикратное изменение концентрации одновалентного иона достигается на участке, где потенциал изменяется на 58 мВ.

Возникновение межфазной разности потенциалов, определяемой уравнением (XVIII.3.10), связано с разделением зарядов в окрестностях границы раздела и с образованием двойного электрического слоя. Вопрос о характере распределения электрического потенциала в двойном слое, в частности вблизи границы раздела вода — неполярный растворитель, решается на основании одного из основных уравнений электростатики — уравнения Пуассона. Для рассматриваемого одномерного случая (одна пространственная координата — x) это уравнение имеет вид

$$d^2\varphi/dx^2 = -4\pi\rho(x)/\epsilon, \quad (\text{XVIII.4.2})$$

где $\rho(x)$ — плотность электрических зарядов в плоскости x :

$$\rho(x) = F \sum_i z c_x, \quad (\text{XVIII.4.3})$$

ϵ — абсолютная диэлектрическая постоянная, принимающая значения ϵ_1 при $x < 0$ и ϵ_2 при $x > 0$. Уравнение Пуассона связывает вторую производную потенциала в плоскости x с плотностью зарядов в этой плоскости. Если концентрацию электролита в объеме фазы принять равной c , то, учитывая уравнение Больцмана (XVIII.4.1), плотность зарядов может быть записана в виде

$$\rho = zF(c_{A+} - c_{B-}) = zFc(e^{-zF\varphi/(RT)} - e^{zF\varphi/(RT)}), \quad (\text{XVIII.4.4})$$

где $\varphi = \varphi(x) - \varphi(\infty)$ — потенциал в плоскости x относительно потенциала в объеме фазы $\varphi(\infty)$, а $z = z_+ = -z_-$. Для случая, когда значение потенциала на границе раздела $\varphi(0)$ относительно потенциала в объеме фазы невелико, экспоненциальные члены в уравнении (XVIII.4.4) могут быть разложены в ряд.

После введения подобных упрощений уравнение Пуассона — Больцмана принимает вид

$$d^2\varphi/dx^2 = \kappa^2\varphi, \quad (\text{XVIII.4.5})$$

где

$$\kappa^2 = 8\pi c z^2 F^2 / (RT\epsilon). \quad (\text{XVIII.4.6})$$

Решение уравнения (XVIII.4.5) имеет вид (приближение Дебая, или модель Гуи)

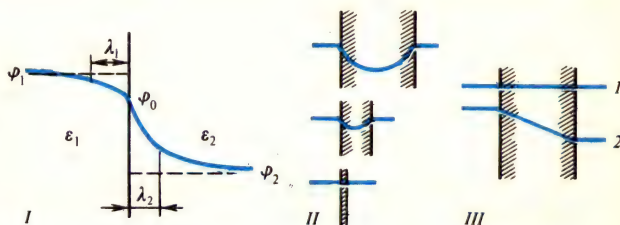
$$\varphi = \varphi_0 e^{-\kappa|x|}, \quad (\text{XVIII.4.7})$$

где φ_0 и φ — значения электрического потенциала на границе раздела и в плоскости x , измеряемые относительно потенциала в объеме фазы: $|x|$ — абсолютное значение координаты x . Уравнение (XVIII.4.7) показывает, что электрический

потенциал изменяется экспоненциально с изменением расстояния от границы раздела (рис. XVIII.4). Двойной электрический слой распространяется в глубь обеих фаз, по обе стороны от поверхности раздела. Крутизна изменения потенциала в зависимости от расстояния определяется величиной κ , которая зависит от концентрации ионов в данной фазе и диэлектрической проницаемости. Величина κ принимает значение κ_1 и κ_2 для фаз 1 и 2 соответственно. Основное изменение потенциала вблизи границы раздела происходит на расстоянии, равном $1/\kappa$. Величина $\lambda = 1/\kappa$ характеризует толщину каждой обкладки диффузного

Рис. XVIII.4. Профили распределения потенциала на границе раздела фаз (I), в мембранах разной толщины (II), в тонкой мембране в отсутствие внешнего поля (III, 1) и при наложении разности электрических потенциалов (III, 2):

φ_1 , φ_2 — электрические потенциалы в объеме фаз; φ_0 — электрический потенциал на границе раздела, ϵ_1 , ϵ_2 — диэлектрическая проницаемость двух фаз, λ_1 , λ_2 — длина экранирования для первой и второй фаз



двойного слоя и называется длиной экранирования или дебаевской длиной.

Из формулы (XVIII.4.7) видно, что при $\kappa = 1/\lambda$ потенциал φ принимает значение φ_0/ϵ , т. е. примерно на 63% меньше, чем разность потенциалов между границей раздела и объемом фазы. Области с длиной λ_1 и λ_2 справа и слева от поверхности раздела несут избыток ионов разного знака.

Длина экранирования существенно зависит от концентрации электролита в данной фазе:

$$\lambda = \kappa^{-1} = [\epsilon RT / (8\pi c z^2 F^2)]^{1/2}. \quad (\text{XVIII.4.8})$$

В разбавленных водных растворах длина экранирования, т. е. область диффузного двойного слоя, достигает десятков нанометров, а в концентрированных растворах — десятых долей нанометра. В присутствии в растворе двухвалентных ионов двойной электрический слой становится более плотным, т. е. длина экранирования уменьшается.

Длина экранирования зависит главным образом от числа носителей зарядов в данной фазе. Так как концентрация неорганических ионов в неполярном растворителе на несколько порядков меньше, чем в водном растворе, то длина экранирования в неполярной органической фазе намного превосходит длину экранирования в водном растворе.

Важно представлять, в какой пропорции делится полный скачок межфазной разности потенциалов между фазами, т. е. какая часть от суммарной разности потенциалов приходится на водный раствор и какая — на неполярную фазу (рис. XVIII.4). Избыток зарядов, содержащийся в диффузном слое по одну сторону границы раздела, уравнивается избытком зарядов другого знака во второй фазе. Это условие записывается в виде

$$-\int_{-\infty}^0 \rho dx = \int_0^{\infty} \rho dx. \quad (\text{XVIII.4.9})$$

Выразив ρ по формуле (XVIII.4.2), получим

$$\varepsilon_1 \int_{-\infty}^0 \frac{d^2\varphi}{dx^2} dx = -\varepsilon_2 \int_0^{\infty} \frac{d^2\varphi}{dx^2} dx$$

или

$$\varepsilon_1 (d\varphi/dx)_{x=0}^{(1)} = \varepsilon_2 (d\varphi/dx)_{x=0}^{(2)}. \quad (\text{XVIII.4.10})$$

Угол наклона кривой потенциала при переходе через границу раздела изменяется пропорционально отношению диэлектрических проницаемостей фаз (рис. XVIII.4). Физический смысл соотношения (XVIII.4.10) состоит в том, что напряженность электрического поля является непрерывной функцией и не претерпевает разрыва на границе раздела фаз. Так как

$$(d\varphi/dx)_{x=0}^{(1)} = (\varphi_1 - \varphi_0)/\lambda_1 \quad \text{и}$$

$$(d\varphi/dx)_{x=0}^{(2)} = (\varphi_0 - \varphi_2)/\lambda_2,$$

то из соотношения (XVIII.4.10) можно получить выражение, показывающее, в какой пропорции делится межфазная разность потенциалов:

$$(\varphi_1 - \varphi_0)/(\varphi_0 - \varphi_2) = \sqrt{\varepsilon_2 c_2} / \sqrt{\varepsilon_1 c_1}, \quad (\text{XVIII.4.11})$$

где c_1 и c_2 — концентрации электролита в объемах фаз. Поскольку для неполярной фазы (фаза 2) характерны низкие значения диэлектрической постоянной и низкая концентрация носителей заряда, очевидно, что $(\varphi_1 - \varphi_0)/(\varphi_0 - \varphi_2) \ll 1$, т. е. основной скачок потенциала локализован в гидрофобной фазе, а не в водном растворе.

Профиль электрического потенциала в мембранах, омываемых электролитом, существенно зависит от толщины мембраны. Если толщина намного превышает длину экранирования, то ситуация не отличается от случая бесконечно протяженных фаз. Профиль потенциала в такой мембране показан на кривой 1 (рис. XVIII.4, II). Основная часть межфазной разности потенциалов падает в мембране, причем длина экранирования в мембране намного больше длины экранирования в растворе электролита. Так как значения диэлектрической проницаемости в водном растворе и мембране резко отличаются, то из условия (XVIII.4.10) следует, что кривая изменений потенциала претерпевает излом на границе раздела.

В другом предельном случае размер мембраны по толщине намного меньше длины экранирования. Именно такая ситуация возникает в клеточных и бислойных липидных мембранах, толщина которых составляет 7—10 нм. В этом случае скачок потенциала внутри мембраны практически отсутствует (кривая 3 на рис. XVIII.4, II). Можно считать, что в отсутствие внешне приложенного поля потенциал внутри мембраны постоянен по всей ее толщине. Распределение потенциала в такой тонкой мембране при наложении внешнего поля показано на рис. XVIII.4, III. Потенциал внутри тонкой мембраны меняется линейно, а градиент потенциала постоянен по всей ее толщине: $d\varphi/dx = \text{const}$. Предположение о постоянстве электрического поля в биомембранах лежит в основе уравнений, используемых для описания транспорта ионов через биомембраны и для оценки значения мембранного потенциала [уравнения Гольдмана; см. (XIX.2.4)].

§ 5. Двойной электрический слой

В § 4 отмечалось, что значения потенциала в мембранах малой толщины, сформированных из неполярного растворителя, при отсутствии внешнего поля не отличаются от уровня потенциала в окружающих растворах. На рис. XVIII.4 схематично показано, что для таких незаряженных мембран электрический потенциал одинаков на любом удалении от мембраны. Этот вывод не распространяется на мембраны, в структуре которых находятся фиксированные заряды.

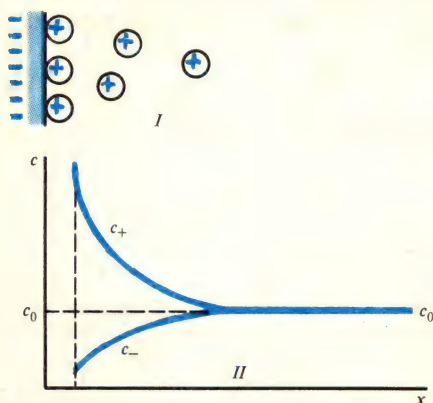


Рис. XVIII.5. Распределение ионов в двойном электрическом слое. I — избыточные катионы; II — концентрация ионов на разных расстояниях от поверхности; c_0 — концентрация электролита в объеме, c_+ и c_- — концентрации катионов и анионов; по оси абсцисс отложено расстояние от границы раздела, по оси ординат — концентрация электролита

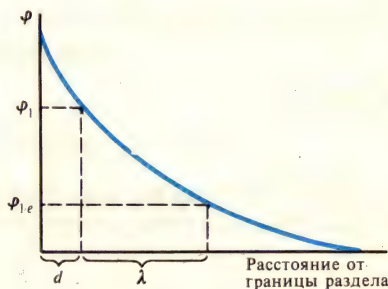


Рис. XVIII.6. Распределение потенциала (φ) в двойном электрическом слое: d — толщина плотного слоя, λ — длина экранирования; φ_1 — потенциал в плоскости максимального приближения свободных катионов

Наличие фиксированных поверхностных зарядов клеточных мембран приводит к образованию около мембраны двойного электрического слоя, который является важным фактором в протекании многих биоэлектрохимических процессов.

Согласно представлениям, развитым в работах Г. Гуи и Д. Л. Чэпмена (1910), распределение ионов в области заряженной поверхности определяется двумя факторами: электростатическим притяжением, удерживающим противоионы у поверхности, и тепловым движением этих ионов, стремящихся, наоборот, к выравниванию их концентраций в поверхностном слое и объеме. В устанавливающемся равновесии плотность распределения ионов около заряженной поверхности убывает с увеличением расстояния от поверхности. Равновесные концентрации катионов (\hat{c}_+) и анионов (\hat{c}_-) в поверхностном слое и в объеме раствора представлены схематически на рис. XVIII.5. Слой раствора с измененными концентрациями вблизи поверхности называется диффузным. В зависимости от условий его толщина изменяется на несколько порядков — от десятых нанометров до микрометров.

Концентрация ионов вблизи заряженной поверхности определяется законом Больцмана [см. (XVIII.4.1)]. Профиль потенциала в области двойного слоя (рис. XVIII.6) определяется уравнением Пуассона — Больцмана, которое

получается при объединении уравнения Пуассона [см. (XVIII.4.2)] с учетом определения плотности зарядов в плоскости x [см. (XVIII.4.3)] и уравнения Больцмана [см. (XVIII.4.1)]. Уравнение Пуассона — Больцмана имеет вид

$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -\frac{4\pi F}{\varepsilon} \Sigma z c_0 e^{-zF\varphi/(RT)}. \quad (\text{XVIII.5.1})$$

В § 4 приведено решение уравнения Пуассона — Больцмана для случая малых потенциалов. Если ограничиться случаем бинарного симметричного электролита, для которого $c_{0+} = c_{0-} = c$ и $z_+ = -z_-$, то уравнение (XVIII.5.1) после некоторых преобразований упрощается и приобретает следующий вид:

$$d\varphi/dx = -\sqrt{8\pi RTc/\varepsilon} (e^{zF\varphi/(2RT)} - e^{-zF\varphi/(2RT)}). \quad (\text{XVIII.5.2})$$

Потенциал часто выражают через безразмерные величины:

$$\psi = zF\varphi/(RT). \quad (\text{XVIII.5.3})$$

В этом случае

$$d\varphi/dx = -\sqrt{8\pi RTc/\varepsilon} (e^{\psi/2} - e^{-\psi/2}). \quad (\text{XVIII.5.4})$$

Условие электронейтральности двойного электрического слоя выражается равенством поверхностного заряда (σ) и суммарного заряда диффузного слоя:

$$\sigma = -\int_0^\infty \rho dx. \quad (\text{XVIII.5.5})$$

Выразив ρ из (XVIII.4.2) и подставляя в (XVIII.5.5), находим

$$\sigma = \int_0^\infty [\varepsilon/(4\pi)] (d^2\varphi/dx^2) dx = -[\varepsilon/(4\pi)] (d\varphi/dx)_{x=0}. \quad (\text{XVIII.5.6})$$

Подставляя значение $d\varphi/dx$ из (XVIII.5.4), получаем уравнение Гуи—Чэпмена

$$\begin{aligned} \sigma &= \sqrt{\varepsilon RTc/(2\pi)} (e^{\psi/2} - e^{-\psi/2}) \quad \text{или} \\ \sigma &= (2\varepsilon RTc/\pi)^{1/2} \text{sh}(\psi/2). \end{aligned} \quad (\text{XVIII.5.7})$$

Формула (XVIII.5.7) выражает соотношение между плотностью поверхностного заряда (σ), поверхностным потенциалом (ψ) и равновесной концентрацией электролита в растворе c .

Уравнение (XVIII.5.7) учитывает лишь кулоновские взаимодействия противоионов с фиксированными зарядами и не учитывает специфической адсорбции противоионов под действием некулоновских (ван-дер-ваальсовых) сил. Это специфическое взаимодействие, характерное для адсорбции многовалентных ионов, заряженных красителей, алкалоидов, поверхностно-активных веществ, рассматривается в теории Штерна (1924).

Измеряя с помощью различных методов поверхностный потенциал, удается определить плотность поверхностных зарядов в мембранах. Учет поверхностного потенциала и электростатических взаимодействий ионов с фиксированными зарядами позволил, например, объяснить влияние солей на интенсивность флуоресценции хлорофилла (см. § 3, 4 гл. XXVII), взаимодействие заряженных красителей и редокс-медиаторов с фотосинтетической мембраной.

Катионы щелочных металлов и двухвалентные катионы оказывают влияние на поверхностный потенциал в основном посредством экранирования фикси-

рованных зарядов мембраны. В отличие от этого ионы H^+ оказывают свое действие преимущественно путем связывания — протонирования соответствующих группировок, т. е. путем влияния на плотность фиксированных зарядов σ . По этой причине H^+ и другие ионы, способные к специфической адсорбции на мембранах, называют потенциалопределяющими ионами в отличие от индифферентных, которые участвуют лишь в экранировании фиксированных зарядов.

Поверхностный потенциал мембраны не может быть экспериментально измерен прямыми методами. Можно, однако, изменить другую, близкую к ϕ величину — электрокинетический потенциал ζ , называемый дзета-потенциалом. Дзета-потенциал определяют как потенциал границы скольжения, также отсчитываемый от уровня потенциала в объеме раствора. Граница скольжения определяется первым слоем ионов с их гидратными оболочками и первым слоем молекул воды, смачивающих твердую фазу. Этот слой не перемещается относительно заряженной поверхности и увлекается вместе с мембранной частицей при ее движении относительно жидкости. Поэтому обычно полагают, что $\zeta \leq \phi_1$ (рис. XVIII.6). Различие между ζ и ϕ должно быть тем менее заметным, чем меньше $d\phi/dx$, т. е., согласно (XVIII.5.2), уменьшаться в области разбавленных растворов.

Величину дзета-потенциала можно рассчитать, измеряя скорость движения заряженных мембранных частиц в электрическом поле по формуле Смолуховского:

$$\zeta = 4\pi\eta v / (eE), \quad (\text{XVIII.5.8})$$

где η — вязкость среды, v — скорость перемещения частиц, E — градиент потенциала внешнего электрического поля.

Наличие на поверхности фиксированных электрических зарядов лежит в основе электрокинетических явлений, открытых в 1808 г. профессором Московского университета Ф. Ф. Рейсом. Он обнаружил явление переноса жидкости под действием внешнего электрического поля, возникающее как в капиллярно-пористых телах, так и в одиночных капиллярах. Это явление получило название электроосмоса; перемещение частиц дисперсной фазы в электрическом поле названо электрофорезом. Позже, во второй половине XIX в., было обнаружено возникновение разности потенциалов на пористой мембране при фильтрации через нее воды: разность потенциалов была пропорциональна давлению, под которым протекала жидкость. Это явление, обратное электроосмосу, называется потенциалом течения. Явление, обратное электрофорезу, называется потенциалом оседания и состоит в том, что при оседании заряженных частиц регистрируется разность потенциалов между двумя электродами, расположенными на разной высоте.

На основе кинетических представлений о механизме электрокинетических явлений удается установить между ними количественные связи. Величина объема жидкости, переносимого электроосмосом через капилляр в единицу времени, или величина объемного электроосмотического потока J , определяется следующим выражением:

$$(J)_{\Delta p=0} = e\zeta I / (4\pi\eta\lambda), \quad (\text{XVIII.5.9})$$

где I — сила тока, проходящего через капилляр, λ — удельная электропроводность жидкости, e — диэлектрическая постоянная, η — коэффициент вязкости, ζ — электрокинетический потенциал. Можно показать, что отношение потенциала течения ($\Delta\phi$) к разности давлений (Δp) в состоянии, когда $I=0$, задается выражением

$$(\Delta\phi/\Delta p)_{I=0} = e\zeta / (4\pi\eta\lambda). \quad (\text{XVIII.5.10})$$

Сравнивая два последних выражения, можно найти количественную связь между явлениями электроосмоса и потенциала течения:

$$(J/I)_{\Delta p=0} = (\Delta\varphi/\Delta p)_{I=0} = e\xi/(4\pi\eta\lambda). \quad (\text{XVIII.5.11})$$

Соотношение (XVIII.5.11) может быть получено на основе представлений Онзагера без привлечения данных о молекулярно-кинетических механизмах наблюдаемых явлений.

Действительно, используя (V.3.4) и (V.3.5), можно записать общие феноменологические уравнения переноса через мембрану при постоянной температуре вещества под действием разности давлений и электрического тока I , обусловленного разностью потенциалов $\Delta\varphi$:

$$\begin{aligned} J &= L_{11}\Delta p + L_{12}\Delta\varphi \\ I &= L_{21}\Delta p + L_{22}\Delta\varphi; \quad L_{21} = L_{12}. \end{aligned} \quad (\text{XVIII.5.12})$$

Из этих соотношений в соответствии с данными выше определениями каждого электрокинетического явления можно легко найти следующие выражения.

В случае электроосмоса ($\Delta p=0$) имеем

$$(J/I)_{\Delta p=0} = L_{12}/L_{22}. \quad (\text{XVIII.5.13})$$

Для тока переноса ($\Delta\varphi=0$)

$$(I/J)_{\Delta\varphi=0} = L_{21}/L_{11}. \quad (\text{XVIII.5.14})$$

Потенциал течения ($I=0$) описывается как

$$(\Delta\varphi/\Delta p)_{I=0} = -L_{21}/L_{22}. \quad (\text{XVIII.5.15})$$

Для электроосмотического давления

$$(\Delta p/\Delta\varphi)_{J=0} = -L_{12}/L_{11}. \quad (\text{XVIII.5.16})$$

Сравнивая между собой выражения (XVIII.5.13) — (XVIII.5.15), находим два связывающих уравнения:

$$(\Delta\varphi/\Delta p)_{I=0} = -(J/I)_{\Delta p=0}. \quad (\text{XVIII.5.17})$$

$$(\Delta p/\Delta\varphi)_{J=0} = -(I/J)_{\Delta\varphi=0}. \quad (\text{XVIII.5.18})$$

Как видно, уравнение (XVIII.5.17) совпадает с (XVIII.5.11). Однако преимущество термодинамического вывода состоит в том, что он справедлив независимо от характера конкретной молекулярно-кинетической модели движения жидкости через капилляр, которая лежит в основе формулы (XVIII.5.11).

§ 6. Доннановское равновесие

Рассмотрим еще один вид ионного равновесия между двумя фазами, которое возникает, если одна из фаз несет заряды, не способные перейти в другую фазу. Такое ограничение подвижности ионов может быть обусловлено либо тем, что ионы фиксированы в объеме фазы, как, например, в ионообменных смолах, либо наличием между растворами мембраны, проницаемой для растворителя и малых ионов, но непроницаемой для ионов с размерами коллоидных частиц.

Пусть в системе из двух водных фаз растворен бинарный электролит A^+B^- . Предположим, что одна из фаз несет фиксированные положительные заряды

и что значения стандартных химических потенциалов для обеих фаз одинаковы. Из условия равновесия (XVIII.3.1) получаем

$$\varphi_1 - \varphi_2 = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_{A_2}}{c_{A_1}} = - \frac{RT}{F} \ln \frac{c_{B_2}}{c_{B_1}}, \quad (\text{XVIII.6.1})$$

где c_{A_1} и c_{A_2} — концентрации подвижных катионов, c_{B_1} и c_{B_2} — концентрации подвижных анионов в двух фазах. Из уравнения (XVIII.6.1) непосредственно следует соотношение

$$c_{A_2} c_{B_2} = c_{A_1} c_{B_1}. \quad (\text{XVIII.6.2})$$

В фазе 1, не содержащей фиксированных зарядов, концентрация электролита равна c , а концентрации катионов и анионов одинаковы: $c_{A_1} = c_{B_1} = c$. Следовательно,

$$c_{A_1} c_{B_1} = c^2; \quad c_{A_2} c_{B_2} = c^2. \quad (\text{XVIII.6.3})$$

Если плотность положительных фиксированных зарядов в фазе 2 равна Q , то условие электронейтральности для этой фазы имеет вид

$$\varphi_2 - \varphi_1 = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_{A_1}}{c_{A_2}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{c}{c - Q/2} = - \frac{RT}{F} \ln [1 - Q/(2c)], \quad (\text{XVIII.6.4})$$

Комбинируя уравнения (XVIII.6.3) и (XVIII.6.4), получим

$$c_{A_2}(c_{A_2} + Q) = c^2. \quad (\text{XVIII.6.5})$$

Решая это квадратное уравнение, находим концентрацию свободно диффундирующих ионов в фазе 2:

$$c_{A_2} = -Q/2 + (Q^2/4 + c^2)^{1/2}. \quad (\text{XVIII.6.6})$$

Из полученного решения видно, что распределение свободных ионов в системе существенно зависит от концентрации фиксированных зарядов и от концентрации ионов во внешней среде (фаза 1).

В том случае, когда плотность фиксированных зарядов мала ($Q \ll c$), концентрации свободных катионов и анионов в заряженной фазе равны

$$c_{A_2} = -Q/2 + c; \quad c_{B_2} = Q/2 + c. \quad (\text{XVIII.6.7})$$

Это означает, что заряд недиффундирующих катионов в фазе 2 компенсируется повышенным содержанием в ней анионов и более низким содержанием катионов. Доннановская разность потенциалов в этом случае равна

$$\varphi_2 - \varphi_1 = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_{A_1}}{c_{A_2}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{c}{c - Q/2} = - \frac{RT}{F} \ln [1 - Q/(2c)],$$

или после разложения $\ln[1 - Q/(2c)]$ в ряд по формуле $[\ln(1 - x) \approx -x]$

$$\varphi_2 - \varphi_1 = (RT/F)[Q/(2c)]. \quad (\text{XVIII.6.8})$$

Если, например, $Q = 0,2c$, то $\varphi_2 - \varphi_1 \approx 2,5$ мВ.

В другом предельном случае, когда объемная плотность фиксированных зарядов велика по сравнению с концентрацией электролита во внешней среде ($Q \gg c$), получаем из уравнения (XVIII.6.6)

$$c_{A_2} = -Q/2 + (Q/2)(1 + 4c^2/Q^2)^{1/2} = (Q/2)[-1 + (1 + 4c^2/Q^2)^{1/2}].$$

Разлагая в ряд $(1 + 4c^2/Q^2)^{1/2}$, по формуле $(1 + x)^m \approx 1 + mx$ получаем

$$c_{A_2} = (Q/2)[-1 + (1 + 2c^2/Q^2)] = c^2/Q. \quad (\text{XVIII.6.9})$$

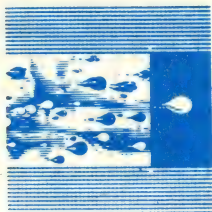
Таким образом, концентрация свободных катионов в фазе 2 (c_{A_2}) в этом случае низка, т. е. катионы вытесняются из этой фазы. Заряд недиффундирующих катионов в этом случае полностью компенсируется анионами, которые аккумулируются в фазе 2 до концентрации ($c_{B_2} = Q + c^2/Q$), намного превышающей концентрацию электролита в водном растворе. Скачок потенциала между фазами для этого случая равен

$$\varphi_2 - \varphi_1 = (RT/F) \ln(c_{A_1}/c_{A_2}) = (RT/F) \ln(Q/c). \quad (\text{XVIII.6.10})$$

Из уравнения (XVIII.6.10) видно, что в разбавленных растворах ($c \ll Q$) равновесная разность потенциалов в доннановской системе может быть достаточно высокой.

Глава XIX

Электродиффузионная теория транспорта ионов через мембраны



В условиях электрохимического равновесия суммарные ионные потоки в системе отсутствуют, в противном случае возникает пассивное движение ионов по градиенту электрохимического потенциала. При неодинаковых подвижностях ионов разного вида в жидкости (или в мембране) возникает диффузионная разность потенциалов, которая в отличие от разностей потенциалов в равновесных системах зависит не только от ионных концентраций в соприкасающихся растворах, но и от кинетического параметра — подвижности ионов.

Теории пассивного мембранного транспорта ионов были разработаны применительно к физико-химическим мембранам. Существует два основных подхода к описанию прямого прохождения заряженных частиц: дискретный и непрерывный. В дискретном подходе, основанном на эйринговской теории абсолютных скоростей реакций, предполагают, что частица преодолевает мембрану с помощью нескольких дискретных перескоков через активационные барьеры. Непрерывный подход основан на представлении об электродиффузии частиц в однородной мембране.

Непрерывный подход, основанный на электродиффузионной модели, наиболее оправдан для описания транспорта ионов через искусственные липидные мембраны. Для описания транспорта ионов через селективные ионные каналы клеточных мембран логичнее использовать дискретный подход (см. гл. XX).

§ 1. Уравнение электродиффузии Нернста — Планка

В электродиффузионной модели мембрану рассматривают как непрерывную гомогенную среду, в которой происходит диффузия точечных невзаимодействующих частиц. Суммарный поток произвольного вида ионов j , движущихся пассивно и независимо в такой гомогенной среде в направлении оси x , пропорционален концентрации ионов, их подвижности и действующей на ион силе. Общее транспортное уравнение имеет вид:

поток = концентрация \times действующая сила \times подвижность.

Таким образом, поток J ионов j , концентрация которых в плоскости x равна c , а подвижность u , равен [ср. (V.3.2)]

$$J = cu(-d\bar{\mu}/dx). \quad (\text{XIX.1.1})$$

Учитывая определение электрохимического потенциала [см. (XVIII.1.2)] и подставляя в уравнение (XIX.1.1) значение производной $d\bar{\mu}/dx$, получим

$$J = -uRTdc/dx - uczFd\varphi/dx, \quad (\text{XIX.1.2})$$

где z — валентность иона, T — абсолютная температура, R — газовая постоянная, F — число Фарадея. Уравнение (XIX.1.2) называется уравнением электродиффузии или уравнением Нернста — Планка и описывает диффузию ионов в растворе или в гомогенной незаряженной мембране. Первый член в правой части уравнения описывает свободную диффузию (диффузионная компонента общего потока), второй выражает миграцию ионов в электрическом поле (миграционная компонента). Размерность потока — моль·см⁻²·с⁻¹.

Задача описания диффузии заряженных частиц предполагает решение системы двух уравнений, одно из которых — уравнение Нернста — Планка (XIX.1.2), второе — уравнение Пуассона (XVIII.4.2). Для упрощения электродиффузионной задачи вводят дополнительные условия, например допущение о постоянстве одного из градиентов в мембране ($dc/dx = \text{const}$ или $d\varphi/dx = \text{const}$) или допущение об электронейтральности мембраны.

В подходе Планка — Гендерсона к решению электродиффузионного уравнения (XIX.1.2) предполагают, что условие электронейтральности выполняется не только для объема фаз, разделенных мембраной, но и для самой мембраны. Иначе говоря, предполагают, что концентрации катионов и анионов в любой плоскости по оси x одинаковы ($c_+ = c_-$). В стационарном состоянии при условии разомкнутой цепи суммарный электрический ток через мембрану не течет, т. е. сумма переносимых катионов равна сумме переносимых анионов. Для бинарного электролита, содержащего одновалентный катион и одновалентный анион, условие равенства потоков имеет вид

$$u_+ RT \, dc/dx + u_+ cF \, d\varphi/dx = u_- RT \, dc/dx - u_- cF \, d\varphi/dx, \quad (\text{XIX.1.3})$$

где u_+ и u_- — подвижности катиона и аниона в мембране. Отсюда

$$\frac{d\varphi}{dx} = - \frac{u_+ - u_-}{u_+ + u_-} \frac{RT}{F} \frac{1}{c} \frac{dc}{dx}. \quad (\text{XIX.1.4})$$

Учитывая, что $(1/c)(dc/dx) = d \ln c / dx$ и интегрируя уравнение (XIX.1.4), получаем

$$\Delta\varphi = \frac{u_+ - u_-}{u_+ + u_-} \frac{RT}{F} \ln \frac{c_2}{c_1}, \quad (\text{XIX.1.5})$$

где $\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1$. Соотношение (XIX.1.5) называется уравнением Гендерсона. Оно позволяет рассчитать диффузионный потенциал, возникающий между двумя растворами электролита разной концентрации. Например, при соприкосновении двух растворов NaCl начинается диффузия ионов через границу раздела. Так как подвижность Cl^- в водном растворе примерно в 1,5 раза выше подвижности Na^+ ($u_{\text{Cl}} \approx 1,5 u_{\text{Na}}$), то ион Cl^- продвигается по градиенту концентрации быстрее, чем Na^+ , в результате чего разбавленный раствор приобретает отрицательный потенциал по отношению к концентрированному раствору. Возникающая разность потенциалов между растворами замедляет движение анионов и ускоряет движение катионов, т. е. приводит к выравниванию скоростей диффузии катионов и анионов. В том случае, если соприкасающиеся растворы NaCl отличаются по концентрации в 10 раз, разность потенциалов между ними составляет примерно 12 мВ.

Уравнение Гендерсона (XIX.1.5) пригодно для мембран макроскопической толщины (порядка микрометров и более), но несправедливо в случае тонких липидных и клеточных мембран, где условия локальной электронейтральности по всей толщине мембраны не соблюдаются. Это связано с тем, что вследствие неодинаковой липофильности катионов и анионов их концентрации в мембране неодинаковы (см. § 3 гл. XVIII). Существенно также, что толщина биомембран меньше дебаевского радиуса экранирования (см. выше). Следовательно, уравнение Гендерсона непригодно для описания мембранного потенциала клетки.

§ 2. Приближение постоянного поля

Второй подход к решению уравнения Нернста — Планка, известный как приближение постоянного поля, основан на предположении о линейности изменения электрического потенциала или постоянства напряженности поля по всей толщине мембраны ($d\varphi/dx = \text{const}$). Это условие выполняется для тонких мембран, в которых концентрация носителей зарядов мала, а толщина двойного электрического слоя очень велика (см. § 4 гл. XVIII), т. е. в случае диффузии ионов через липидные бислои и клеточные мембраны.

Если профиль электрического потенциала в мембране с толщиной h линейен ($d\varphi/dx = \varphi/h = \text{const}$), то уравнение Нернста — Планка (XIX.1.2) приобретает вид неоднородного линейного дифференциального уравнения

$$dc/dx + Ac = -B, \quad (\text{XIX.2.1})$$

где $A = zF\varphi/(RT\hbar)$, $B = J/(uRT)$, φ — трансмембранная разность потенциалов. Решение уравнения (XIX.2.1) показывает зависимость суммарного пассивного потока ионов j (J_j) от разности потенциалов на мембране (φ) и концентраций ионов на краях мембраны:

$$J_j = \frac{zF\varphi u}{h} \frac{c' - c'' \exp[zF\varphi/(RT)]}{1 - \exp[zF\varphi/(RT)]}, \quad (\text{XIX.2.2})$$

где c' и c'' — концентрации иона j на краях в фазе мембраны в плоскостях $x=0$ и $x=h$. Для практического использования уравнения (XIX.2.2) необходимо произвести замену концентраций c' и c'' , относящихся к фазе мембраны, на концентрации ионов в растворах по обе стороны мембраны. А. Ходжкин и Б. Катц предположили, что концентрации ионов на краях мембраны (c' и c'') пропорциональны соответственно концентрациям в наружном и внутреннем омывающих растворах (c_o и c_i):

$$c' = \gamma c_o; \quad c'' = \gamma c_i, \quad (\text{XIX.2.3})$$

где γ — коэффициент распределения, зависящий от липофильности иона. Тогда уравнение (XIX.2.2) для пассивного потока ионов через мембрану примет вид

$$J = \frac{zF\varphi P}{RT} \frac{c_o - c_i \exp[zF\varphi/(RT)]}{1 - \exp[zF\varphi/(RT)]}. \quad (\text{XIX.2.4})$$

Величина P ($P = uRT\gamma/h$), называемая коэффициентом проницаемости, имеет размерность см/с [см. (XVII.1.2)]. Она прямо пропорциональна подвижности иона в мембране и коэффициенту распределения и обратно пропорциональна толщине мембраны. Значение тока (J), переносимого данным ионом, равно $I = zFJ$.

Уравнение (XIX.2.4), выведенное Д. Е. Гольдманом (1943) и дополненное А. Ходжкиным и Б. Катцем (1949), позволяет рассчитать пассивный поток иона, если известны его концентрация в растворах по обе стороны мембраны, разность потенциалов на мембране и проницаемость мембраны для данного иона. Для оценки коэффициента проницаемости мембраны необходимо с помощью радиоактивной метки определить односторонние потоки и суммарный поток иона, и также убедиться в том, что в транспорте иона не принимают участия системы активного транспорта. На мембранах растительных клеток значения коэффициентов проницаемости для K^+ варьируют в пределах от 10^{-8} до 10^{-6} см/с; значения P_{Na} обычно на порядок ниже значений P_K , а значения P_{Cl} не превышают 10^{-8} см/с.

Проницаемость и проводимость. Понятие ионной проницаемости следует отличать от ионной проводимости. Эти два свойства тесно связаны между собой, и фактически изменения проницаемости всегда сопровождаются изменениями проводимости. Проницаемость P_j является свойством мембраны и в первом приближении не зависит от содержания ионов в окружающих растворах. Проводимость мембраны g_j характеризует изменение потока ионов j при небольших сдвигах мембранного потенциала:

$$g_j = zF dJ_j / d\varphi = dI_j / d\varphi, \quad (\text{XIX.2.5})$$

где $zF dJ_j = dI_j$ — изменение тока, переносимого ионами j в ответ на небольшое смещение разности потенциалов на мембране $d\varphi$. Так как количество переносимых ионов j зависит от их концентрации в растворах, то и проводимость по иону j в отличие от проницаемости P_j зависит от содержания ионов данного вида в наружном и внутреннем растворах. Если концентрации ионов по обе стороны мембраны одинаковы, то проводимость мембраны по одновалентному иону j определяется простым уравнением

$$g_j = F^2 P_j c / (RT). \quad (\text{XIX.2.6})$$

Суммарная проводимость мембраны (величина, обратная электрическому сопротивлению мембраны) равна сумме проводимостей мембраны для отдельных ионов и определяется как изменение суммарного электрического тока (I) через мембрану в ответ на небольшое смещение мембранного потенциала:

$$g_m = \sum_j g_j = dI / d\varphi. \quad (\text{XIX.2.7})$$

Вольт-амперные характеристики. Уравнение Гольдмана (XIX.2.4) предсказывает нелинейную зависимость трансмембранного потока ионов от разности потенциалов на мембране. При больших положительных и больших отрицательных потенциалах поток линейно зависит от разности потенциалов, однако коэффициенты пропорциональности различны. При $\varphi \rightarrow -\infty$ и $\varphi \rightarrow +\infty$ зависимости ионного тока от потенциала аппроксимируются асимптотами $J = P_{c_o} z F \varphi / (RT)$ и $J = P_{c_i} z F \varphi / (RT)$ соответственно (рис. XIX.1). Нелинейность характеристики тем больше, чем больше перепад концентраций в растворах справа и слева от мембраны; зависимость линейна, если концентрации иона в обоих растворах одинаковы. В равновесии, когда ионный ток равен нулю ($J=0$), из уравнения (XIX.2.4) следует, что $c_o - c_i \exp[zF\varphi/(RT)] = 0$ и соответственно равновесное значение $\varphi = [RT/(zF)] \ln(c_o/c_i)$ находится как точка пересечения кривых с осью потенциала. Суммарная вольт-амперная характеристика мембраны совпадает по форме с характеристикой ток — напряжение для того вида иона, который вносит основной вклад в проводимость мембраны.

Причины нелинейности вольт-амперной характеристики при резком отличии ионных концентраций по обе стороны мембраны вызваны влиянием электрического поля на профиль концентрации ионов в мембране (рис. XIX.2). При наложении электрического поля различной ориентации концентрация токопереносящих ионов в мембране либо повышается, либо уменьшается, что приводит соответственно к повышению или снижению электропроводности мембраны — эффект выпрямления.

Выражение для разности потенциалов, создаваемой на мембране в результате диффузии ионов, выводят из уравнения для ионных потоков (XIX.2.4). В равновесии, когда электрический ток через мембрану не течет, сумма

токов, переносимых отдельными ионами, равна нулю: $\sum_i I_i = 0$. При учете только одновалентных ионов

$$I_K + I_{Na} + I_{Cl} = 0. \quad (\text{XIX.2.8})$$

После подстановки и сокращения всех членов на общие множители, получим

$$P_K [K_o] - P_K [K_i] \exp [F\varphi / (RT)] + P_{Na} [Na_o] - P_{Na} [Na_i] \exp [F\varphi / (RT)] + \\ + P_{Cl} [Cl_i] - P_{Cl} [Cl_o] \exp [F\varphi / (RT)] = 0. \quad (\text{XIX.2.9})$$

Решая полученное уравнение относительно φ , находим выражение для мембранного потенциала:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K_o] + P_{Na} [Na_o] + P_{Cl} [Cl_i]}{P_K [K_i] + P_{Na} [Na_i] + P_{Cl} [Cl_o]}, \quad (\text{XIX.2.10})$$

где φ — разность потенциалов на мембране, P_j — проницаемости соответствующих ионов; индексы o и i относятся к концентрациям ионов в наружной и внутренней фазах. Выражение (XIX.2.10) называется уравнением Гольдмана для мембранного потенциала. Оно показывает, что электрический потенциал на мембране определяется различием в стационарных концентрациях

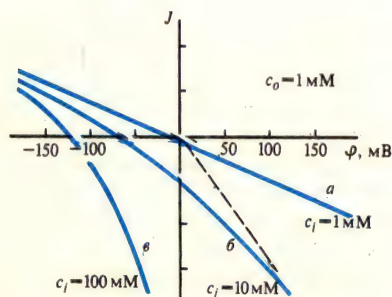


Рис. XIX.1. Вольт-амперные характеристики в теории постоянного электрического поля

Показаны зависимости потока одновалентных ионов от потенциала при равенстве ионных концентраций по обе стороны от мембраны (а); при 10-кратном (б) и 100-кратном (в) различии концентраций

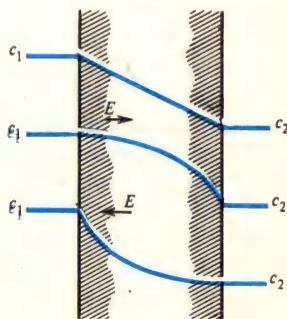


Рис. XIX.2. Профили концентрации катионов в мембране в отсутствие поля и при наложении внешнего электрического поля (E) разной направленности

ионов по обе стороны мембраны и разными коэффициентами их проницаемости. Соответственно наибольшее влияние на мембранный потенциал оказывает тот ион, который обладает самым высоким коэффициентом проницаемости, что и наблюдается в экспериментах. Соотношение (XIX.2.10) удовлетворительно описывает экспериментальные зависимости потенциала от ионного состава среды при условии, что интервал концентраций не слишком широк. Это указывает на серьезные ограничения электродиффузионной теории для описания электрических характеристик живой клетки.

Соотношение Уссинга. Суммарный поток ионов, определяемый уравнением (XIX.2.4), равен алгебраической сумме двух односторонних потоков: $J = J_i - J_o$, где J_i — поток во внутреннюю фазу, отделенную мембраной, а J_o — поток в наружный раствор. Очевидно, что в выражении (XIX.2.4), описывающем суммарный ионный поток, слагающие члены соответствуют входящему и выходящему потоку. Выражения для односторонних потоков имеют вид

$$\begin{aligned}\bar{J} &= J_i = \frac{zF\varphi P}{RT} \frac{c_o}{1 - \exp[zF\varphi/(RT)]}; \\ \bar{J} &= J_o = \frac{zF\varphi P}{RT} \frac{c_i \exp[zF\varphi/(RT)]}{1 - \exp[zF\varphi/(RT)]},\end{aligned}\quad (\text{XIX.2.11})$$

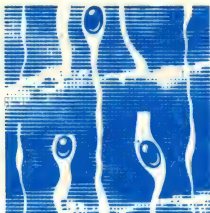
где \bar{J} и \bar{J} — потоки иона, направленные во внутренний и наружный растворы. Как видно из приведенных уравнений, входящий поток линейно зависит от концентраций иона в наружном растворе и не зависит от концентрации во внутренней среде. В свою очередь, выходящий поток зависит только от концентрации во внутреннем растворе. Это и означает, что входящий и выходящий потоки в приближении постоянного поля являются независимыми.

Из уравнения (XIX.2.11) следует, что односторонние потоки связаны между собой соотношением Уссинга — Теорелла:

$$\frac{J_i}{J_o} = \frac{c_o}{c_i \exp[zF\varphi/(RT)]}. \quad (\text{XIX.2.12})$$

Выполнение уравнения Уссинга — Теорелла является критерием пассивного транспорта, при котором поток иона обусловлен только градиентом концентраций и действием электрического поля. Отклонение от равенства (XIX.2.12) может указывать на участие системы активного транспорта в переносе ионов через мембрану или быть следствием нарушения независимости ионных потоков, например при диффузии через узкие каналы в мембране (см. гл. XX). В этом случае обычное электродиффузионное описание [см. (XIX.1.2); (XIX.2.4); (XIX.2.12)], основанное на представлении о диффузии точечных не взаимодействующих частиц, теряет силу.

Односторонние потоки определяют с помощью радиоактивных изотопов, добавляя их в один из растворов и измеряя скорость поступления изотопа в другой раствор, отделенный мембраной.



§ 1. Дискретное описание транспорта

Классическое описание транспорта ионов через биологические мембраны основано на представлении о диффузии не взаимодействующих между собой заряженных частиц в сплошной однородной среде. Электродиффузионные уравнения, полученные в приближении постоянного поля (приближение Гольдмана), составляют теоретическую основу электрофизиологии. Это уравнения [см. (XIX.2.4); (XIX.2.10)], описывающие поток одного вида ионов через мембрану, а также мембранный потенциал в условиях нулевого электрического тока:

$$J = \frac{zF\varphi P}{RT} \frac{c_o - c_i \exp[zF\varphi/(RT)]}{1 - \exp[zF\varphi/(RT)]}; \quad (\text{XX.1.1})$$

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K_o] + P_{Na}[Na_o] + P_{Cl}[Cl_i]}{P_K[K_i] + P_{Na}[Na_i] + P_{Cl}[Cl_o]}. \quad (\text{XX.1.2})$$

Уравнения (XX.1.1) и (XX.1.2), выведенные в приближении постоянного поля, основываются на следующих постулатах: 1) мембрана представляет собой гомогенную фазу; 2) профиль электрического потенциала в мембране линейен ($d\varphi/dx = \text{const}$); 3) концентрация иона в мембране на границе с раствором пропорциональна концентрации этого иона в среде с коэффициентом пропорциональности γ ; 4) ионы движутся через мембрану независимо, не взаимодействуя между собой.

Если представление о линейной зависимости потенциала от расстояния в первом приближении оправдано по отношению к тонким мембранам с толщиной ≤ 10 нм, то другие предпосылки электродиффузионной теории в случае ионного транспорта через биомембраны нарушаются.

Мембрана не является однородной фазой для движения ионов, поскольку перенос ионов через мембраны осуществляется через специализированные участки — ионные каналы, представляющие собой липопротейновые комплексы сложной структуры.

В узких каналах (натриевый — $0,31 \times 0,51$ нм, калиевый — $0,45 \times 0,45$ нм) невозможна независимая диффузия, а допустимо только однорядное движение ионов. Вследствие узости поры в канале могут происходить сильные ион-ионные взаимодействия.

Различия в поверхностных потенциалах на концах поры могут привести и к различным значениям коэффициента распределения. Возможно также существование локальных неоднородностей электрического поля, связанных с зарядами белковой молекулы, образующей канал. Наконец, экспериментальные данные показывают, что в натриевом канале входящий и выходящий потоки подчиняются принципу независимости [см. (XIX.2.12)] в том случае,

когда через канал идет Na^+ , но не другие ионы; калиевый канал в гигантском аксоне кальмара вовсе не подчиняется принципу независимости.

Таким образом, существуют явления, которые нельзя объяснить в рамках представлений о свободной диффузии, — это взаимодействие потоков, насыщение ионных потоков, а также блокировка канала при высоких концентрациях электролита.

В последнее время сформировалась новая теория, в основе которой лежат общие физические принципы.

1. Поступление иона в канал сопровождается замещением воды гидратной оболочки на полярные группы, выстилающие полость канала.

2. Особенности взаимодействия иона с молекулярными группами канала учитываются соответствующими профилями потенциальной энергии иона в канале, который представляется рядом последовательных потенциальных ям и барьеров.

3. Ион достаточно долго (по сравнению со временем тепловых колебаний) задерживается в каждой потенциальной яме. Перескок возможен только в пустую яму. Второй ион не может попасть в занятую потенциальную яму из-за электростатического взаимодействия с уже находящимся там ионом.

4. Перескоки между ямами совершаются под действием тепловых флуктуаций. Вероятность перескока зависит от приложенного электрического поля.

Исходя из этих предположений уравнение для потока ионов можно вывести на основе теории абсолютных скоростей реакций Эйринга, если рассматривать транспорт ионов как серию последовательных перескоков через энергетические барьеры в канале. Наиболее простым и достаточно общим оказывается случай, когда в мембране существует всего три кинетических барьера. Боковые барьеры соответствуют входным участкам канала, где происходит первичный процесс дегидратации, центральный барьер — селективной области (селективный фильтр). Если скорость переноса ионов через канал лимитируется центральным энергетическим барьером, который расположен по середине толщины мембраны (рис. XX.1), то односторонние ионные потоки определяются уравнениями [см. (XIV.1.1)]

$$\begin{aligned}\bar{j} &= c_o A e^{-[E/(RT) + \psi Fz/(2RT)]} = c_o v e^{-[zF\psi/(2RT)]}, \\ \bar{j} &= c_i A e^{-[E/(RT) - \psi Fz/(2RT)]} = c_i v e^{[zF\psi/(2RT)]},\end{aligned}\quad (\text{XX.1.3})$$

где A — константа, E — высота барьера в отсутствие электрического поля, v — константа скорости перехода через основной барьер в отсутствие электрического поля.

Величину $F\psi/(RT)$ часто называют безразмерным потенциалом. Вводя $\psi = F\psi/(RT)$ в уравнения (XX.1.3), получим выражение для тока, переносимого ионами данного вида:

$$I = zF(\bar{j} - \bar{j}) = zFv(c_i e^{z\psi/2} - c_o e^{-z\psi/2}). \quad (\text{XX.1.4})$$

В условиях симметричного ионного окружения ($c_o = c_i = c$) вольт-амперная характеристика канала описывается формулой

$$I = zFvc(e^{z\psi/2} - e^{-z\psi/2}) = zFvc \operatorname{sh}(z\psi/2); \quad \operatorname{sh} x = \frac{1}{2}(e^x - e^{-x}). \quad (\text{XX.1.5})$$

Таким образом, если ток через канал определяется скоростью переноса ионов через основной энергетический барьер, расположенный в центре мембраны, то вольт-амперная характеристика имеет форму гиперболического синуса: с ростом напряжения на мембране проводимость возрастает (со-

гласно приближению постоянного поля, мембрана, находящаяся в симметричном ионном окружении, должна обладать линейной вольт-амперной характеристикой).

По форме вольт-амперной характеристики ионного канала можно выявить, какая стадия, граничная или внутренняя, определяет перенос иона через канал. Рис. XX.2 иллюстрирует соотношение между профилем энергии (I) и формой вольт-амперной характеристики канала (II). Если ток через канал определяется переносом через центральный барьер, то, как видно

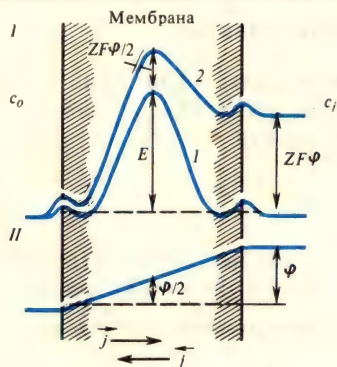


Рис. XX.1. Энергетический профиль в трехбарьерной модели канала (I) в отсутствие поля (1) и при наложении на мембрану разности электрических потенциалов (2) и профиль электрического потенциала (ϕ) на мембране (II):

c_0 , c_i — концентрации электролита в окружающем мембрану растворе, E — высота основного центрального барьера, Z — валентность иона, F — число Фарадея, \vec{j} и \vec{j} — односторонние потоки иона через канал

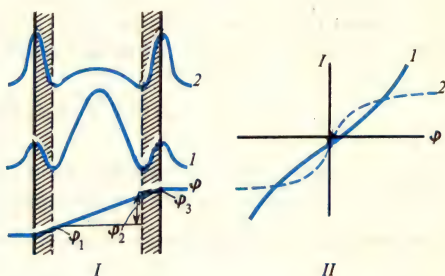


Рис. XX.2. Профили энергии в каналах с внутренней лимитирующей стадией (I, 1) и граничной лимитирующей стадией (I, 2) и соответствующие вольт-амперные характеристики каналов (II): I — поток, ϕ — электрический потенциал, ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_3 — падение напряжения на участках мембраны, соответствующих трем энергетическим барьерам

из (XX.1.5), вольт-амперная характеристика будет наклоняться к оси токов (кривые 1). Если же ток определяется скоростью входа в канал, то при больших напряжениях на мембране все ионы, входящие в канал, будут переноситься через него, а ток стремится к насыщению (кривые 2). Константы скорости переноса ионов через боковые барьеры слабо зависят от электрического поля, поскольку приложенная к мембране разность потенциалов практически вся падает на внутренней части мембраны (падение напряжения ϕ_2), а падение потенциала на границе незначительно (падение напряжения ϕ_1 и ϕ_3). На рис. XX.2 показано, что суммарный скачок потенциала на мембране складывается из небольших по величине скачков потенциала на границах (ϕ_1 и ϕ_3) и основного падения потенциала на внутренней части мембраны.

Как видно из уравнений (XX.1.3), отношение односторонних потоков равно

$$\vec{j}/\vec{j} = (c_0/c_i) e^{-ZF\phi/(RT)}, \quad (XX.1.6)$$

что совпадает с формулой Уссинга [см. (XIX.2.12)], выведенной на основе электродиффузионной модели. Это является следствием того, что выражения

(XX.1.3) — (XX.1.6) были получены для случая разбавленных растворов ионов, когда канал большую часть времени остается пустым и ионы «не мешают» друг другу. Однако и в этом случае симметрия вольт-амперной характеристики существенным образом зависит от положения основного барьера относительно середины мембраны. При расположении основного энергетического барьера у одной из сторон мембраны обнаруживается эффект выпрямления: поток ионов в одном направлении существенно зависит от потенциала, а встречный поток слабо чувствителен к изменениям мембранного потенциала.

§ 2. Блокировка и насыщение канала

В теории постоянного поля проводимость мембраны (для иона i), находящейся в симметричном ионном окружении [см. (XIX.2.6)], должна линейно возрастать с повышением концентрации электролита

$$g_i = z^2 F^2 P_i c_i / (RT). \quad (\text{XX.2.1})$$

Теория одnorядного транспорта в канале должна учитывать нелинейные и немонотонные зависимости проводимости каналов от концентрации. Однако

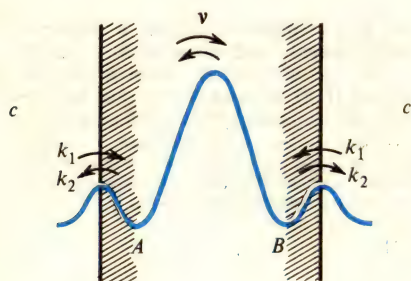


Рис. XX.3. Симметричный энергетический профиль модели канала:
 c — концентрация электролита в окружающем растворе; k_1 , k_2 — константы сорбции и десорбции в участках связывания A и B, v — константа преодоления основного энергетического барьера

формулы (XX.1.3) — (XX.1.5) справедливы лишь при относительно низких концентрациях электролита, когда канал большую часть времени остается пустым. В действительности при высоких концентрациях ионов оба участка связывания на «входе» и «выходе» меняют свои состояния не только в процессе самого транспорта через канал, но и за счет взаимодействия с омывающими растворами. Иными словами, скорость транспорта в канале должна зависеть от вероятности заполнения ионами участков связывания на границах мембраны, что может приводить к заполнению обоих мест связывания и блокировке канала при высоких концентрациях электролита. Рассмотрим модель канала с двумя центрами связывания и одним основным энергетическим барьером (рис. XX.3).

Каждый участок связывания может находиться в одном из двух состояний: заполненном или незаполненном. Вероятность заполнения входного участка канала (Θ) ионами зависит от их концентрации и может быть найдена из условия равновесия потоков, направленных из раствора в канал и обратно (см. § 2 гл. IV). Так, для левого участка связывания условие равенства потоков имеет вид

$$k_1 c (1 - \Theta) = k_2 \Theta, \quad (\text{XX.2.2})$$

где c — концентрация иона в среде, $(1-\Theta)$ — вероятность того, что участок связывания свободен, а k_1 и k_2 — константы. Отсюда следует

$$\Theta = \frac{k_1 C}{k_2 + k_1 C} = \frac{(k_1/k_2)c}{1 + (k_1/k_2)c} = \frac{\gamma c}{1 + \gamma c}, \quad (\text{XX.2.3})$$

где $\gamma = k_1/k_2$ — коэффициент распределения иона. Соответственно

$$1 - \Theta = (1 + \gamma c)^{-1}, \quad (\text{XX.2.4})$$

Уравнение (XX.2.3) показывает, что $\Theta = \gamma c / (1 + \gamma c)$ линейно возрастает с увеличением c в области низких концентраций и выходит на плато при высоких концентрациях.

Односторонний поток слева направо в канале можно выразить в виде произведения $\Theta_A(1-\Theta_B)$, которое отражает вероятность нахождения канала в состоянии 1 0 (левая яма занята ионом, правая — пустая), умноженного на потенциалзависимую константу скорости перехода иона через центральный барьер в состояние 0 1 (левая яма пуста, правая занята ионом):

$$\bar{j} = \Theta_A(1 - \Theta_B) v e^{-F\psi/(2RT)} \quad (\text{XX.2.5})$$

Так как Θ_A и $(1 - \Theta_B)$ определяются концентрациями электролита по разные стороны мембраны, то, согласно (XX.2.5), односторонний поток зависит от концентраций иона в обоих омывающих мембрану растворах. Следовательно, принцип независимости ионных потоков в применении к каналам при высоких концентрациях ионов не соблюдается [см. (XIX.2.12); (XX.1.6)].

Если концентрации транспортируемого иона в обоих омывающих растворах одинаковы и равны c , то односторонний поток равен

$$\begin{aligned} \bar{j} &= \Theta(1 - \Theta) v e^{-F\psi/(2RT)} = \frac{\gamma c}{1 + \gamma c} \frac{1}{1 + \gamma c} v e^{-F\psi/(2RT)} = \\ &= \frac{\gamma c}{(1 + \gamma c)^2} v e^{-F\psi/(2RT)}. \end{aligned} \quad (\text{XX.2.6})$$

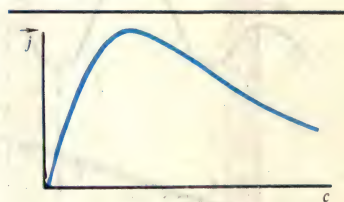


Рис. XX.4. Эффект блокировки потока ионов через канал: c — концентрация электролита, \bar{j} — односторонний поток через канал

При малых концентрациях, когда $\gamma c \ll 1$, поток иона через канал возрастает пропорционально концентрации, однако с дальнейшим ростом концентрации знаменатель в предэкспоненциальном множителе $\gamma c(1 + \gamma c)^{-2}$ растет быстрее, чем числитель, и поток иона через канал тормозится (рис. XX.4). Таким образом, для канала с двумя участками связывания («двухместный канал») характерно снижение проводимости при высоких концентрациях иона в окружающих растворах, когда оба центра связывания заполнены (канал находится в состоянии 1 1). Это наблюдается, например, для грамицидиновых каналов, формируемых в БЛМ, в присутствии повышающихся концентраций Cs^+ .

В экспериментах часто встречается зависимость проводимости канала от концентрации ионов, характеризующаяся насыщением, которое обусловлено нахождением в канале только одного иона. Второй ион не может войти в канал из-за электростатического взаимодействия с ионом, уже находящимся в канале. С ростом концентрации электролита односторонний поток через такой «одноместный» канал стремится к насыщению. Аналогичным образом меняется и проводимость. Такие насыщающиеся зависимости проводимости характерны, например, для каналов, образуемых в БЛМ грами-

цидином в присутствии 5 мМ — 5М растворов NaCl, а также для амфотерициновых каналов при физиологических концентрациях электролита.

§ 3. Функции состояния канала

Ионный канал с одним участком связывания может находиться только в двух состояниях: в свободном или заполненном. Канал с двумя участками связывания может находиться в четырех состояниях, между которыми возможны переходы, изображенные на схеме (рис. XX.5).

Под функциями состояния канала понимают вероятности нахождения канала в отдельных состояниях (т. е. в состояниях 1 0; 0 1; 1 1; 0 0). Проводимость канала (g) зависит от вероятности нахождения канала в состояниях 1 0 и 0 1, поскольку суммарный поток определяется выражением

$$J = l'F(1\ 0) - l''F(0\ 1), \quad (\text{XX.3.1})$$

где $F(1\ 0)$ и $F(0\ 1)$ — вероятности состояний 1 0 и 0 1 соответственно, а l' и l'' —

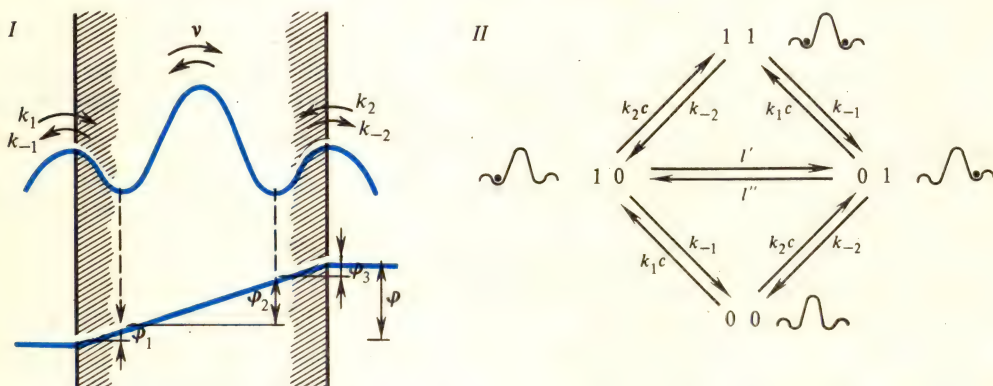


Рис. XX.5. Кинетическая схема переходов между отдельными состояниями для трехбарьерного канала. I — профили энергии и потенциала (φ); II — модель переходов: c — концентрация электролита в водных растворах, k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2} — константы преодоления боковых барьеров, l', l'' — потенциалзависимые константы скорости перехода ионов через центральный барьер, 0 — пустые участки связывания, 1 — заполненные участки связывания (связь между константами l и v дается уравнением (XX.3.2))

l'' — потенциалзависимые константы скорости перехода ионов через центральный барьер:

$$l' = ve^{-\varphi F/(2RT)}; \quad l'' = ve^{\varphi F/(2RT)}. \quad (\text{XX.3.2})$$

В модели одnorядного транспорта функции состояния $F(0\ 0)$, $F(1\ 0)$ и другие находят, решая систему дифференциальных уравнений, составленных на основе приведенной кинетической схемы (см. рис. XX.5, II и § 2 гл. IV). Например, балансное уравнение для функции состояния $F(1\ 0)$ записывается в виде

$$\begin{aligned} \frac{dF(10)}{dt} = & F(0\ 0) k_1 c e^{-zF\varphi_1/(2RT)} + F(0\ 1) v e^{-zF\varphi_2/(2RT)} + \\ & + F(1\ 1) k_{-2} e^{zF\varphi_3/(2RT)} - F(1\ 0) [k_{-1} e^{-zF\varphi_1/(2RT)} v e^{zF\varphi_2/(2RT)} + k_2 c e^{-zF\varphi_3/(2RT)}], \end{aligned} \quad (\text{XX.3.3})$$

где φ_1 , φ_2 и φ_3 — падение потенциала на боковых и центральном барьерах ($\varphi_1 + \varphi_2 + \varphi_3 = \varphi$). Аналогичным образом записывают уравнения для $dF(0\ 0)/dt$; $dF(1\ 1)/dt$ и $dF(0\ 1)/dt$. Поскольку сумма вероятностей всех состояний канала равна единице, условие нормировки имеет вид

$$F(1\ 1) + F(1\ 0) + F(0\ 1) + F(0\ 0) = 1. \quad (\text{XX.3.4})$$

Для решения системы в стационарном случае используют метод диаграмм (Ю. А. Чизмаджев).

§ 4. Ионный канал как динамическая структура

Если один из участков связывания в канале заполнен, то поступление в свободный участок второго иона будет затруднено в связи с необходимостью дополнительных затрат на преодоление энергии кулоновского взаимодействия с уже находящимся в канале ионом. Иначе говоря, попадание иона в левую потенциальную яму приведет к повышению энергетического барьера, соответствующего переходу иона из раствора в правую потенциальную яму (рис. XX.6).

Таким образом, при учете кулоновских взаимодействий вид энергетического профиля зависит от положения и числа ионов в канале. В связи с изменением высоты барьеров изменяются и константы скорости перехода через отдельные барьеры. Например, константа скорости, соответствующая поступлению второго иона в канал, будет равна

$$k_1^{10} = k_1^{00} e^{-W/(2RT)}, \quad (\text{XX.4.1})$$

где W — энергия кулоновского взаимодействия: $W = e^2/(er)$; r — расстояние между потенциальными ямами.

При изменении числа частиц в канале энергетические профили изменяются таким образом, что вход второго иона в канал по сравнению с входом первого затрудняется, а выход второго иона из канала, напротив, идет очень легко. Подробный анализ модели показывает, что кулоновское ион-ионное взаимодействие значительно ускоряет общий ионный транспорт через канал.

Высота барьеров может претерпевать динамические изменения не только за счет кулоновских взаимодействий ионов в канале, но и в результате конформационных перестроек белка, формирующего ионный канал, которые могут инициироваться перескоками иона между отдельными участками связывания. Сильное электрическое поле иона, попадающего в канал, вызывает поляризацию и переориентацию близлежащих полярных групп. В результате появления такого конформационно неравновесного состояния смещается уровень потенциальной энергии в участке связывания и изменяется высота ближайших барьеров.

Особенно важное значение могут иметь циклические изменения конформации мембранных белков, обусловленные биоэнергетическими процессами. Такие периодические конформационные перестройки протекают, по-видимому, в АТФазе энергосопрягающих мембран в процессе ее функционирования, в цитохромах при изменении их окислительно-восстановительного состоя-

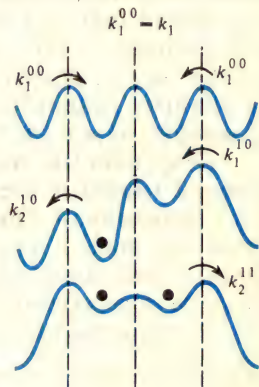


Рис. XX.6. Зависимость энергетического профиля от заполнения канала при учете кулоновских взаимодействий (обозначения те же, что и на рис. XX.5)

ния, в бактериородопсине галофильных бактерий при возбуждении хромофорной группы (см. гл. XXIV; XXX). Это обстоятельство послужило основой для гипотезы о том, что системы активного транспорта ионов, использующие энергию света, АТФ или разности редокс-потенциалов, представляют собой трансмембранный ионный канал с регулируемой высотой энергетических барьеров (см. § 4 гл. XXII).

§ 5. Транспорт в открытом канале. Теория селективности

Исследования ионной проницаемости возбудимых мембран нервных волокон кальмара привели к выводу о существовании в этих мембранах двух основных типов каналов: селективно пропускающих Na^+ и селективных для K^+ . Следует отметить, что представления о наличии у биологических мембран ионной селективности сложились задолго до работ А. Ходжкина и А. Хаксли. Избирательная проницаемость клеточной мембраны нервов для K^+ и возрастание проницаемости при возбуждении для других ионов предполагались Дж. Бернштейном (1902). В теории пор (теория молекулярного сита) П. Бойля и Е. Конвея (1941) проницаемость мембранных пор для ионов определялась прежде всего гидратационным радиусом ионов. Предполагали, что меньший по размеру гидратированный ион K^+ свободнее, чем гидратированный ион Na^+ , проникает через клеточные мембраны.

Современный подход к решению проблемы селективности биомембран основан главным образом на теории ионообменной селективности, созданной Дж. Эйзенманом применительно к ионоселективным стеклянным электродам. Сродство иона к участкам связывания в ионных каналах определяется значением свободной энергии перехода иона из раствора в канал, которое зависит от следующих факторов.

Проникновение иона в пору облегчается тем, что возрастание свободной энергии, обусловленное потерей гидратной оболочки (500—700 кДж/моль), компенсируется понижением энергии при взаимодействии с дипольными группами канала.

Другим важным фактором, облегчающим проникновение иона в канал, является кулоновское взаимодействие транспортируемого катиона с фиксированным анионным центром в просвете канала. Наличие дипольных групп в канале и фиксированных зарядов приводит к тому, что энергия перехода иона из раствора в канал не превышает $\sim 30,5$ кДж/моль.

Переход иона из раствора в полость канала можно формально рассматривать как перенос иона из среды с диэлектрической проницаемостью ϵ_s в среду с диэлектрической проницаемостью ϵ_p и последующее приведение иона в контакт с фиксированным отрицательным зарядом. Поэтому изменение свободной энергии при переходе иона одновалентного из среды в полость канала записывается в виде

$$\Delta W = \frac{e^2}{2a} \left(\frac{1}{\epsilon_p} - \frac{1}{\epsilon_s} \right) - \frac{e^2}{(a+c)\epsilon_p}, \quad (\text{XX.5.1})$$

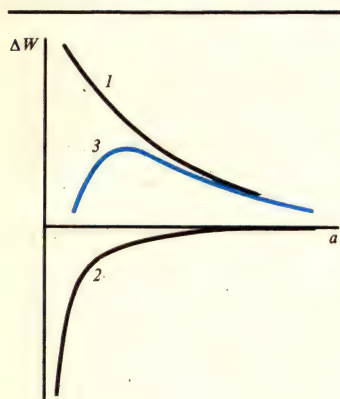


Рис. XX.7. Изменение свободной энергии (ΔW) иона радиуса (a) при переходе из раствора в мембранную пору с фиксированным анионом:

1 и 2 — кривые зависимости энергии дегидратации и энергии кулоновского взаимодействия от ионного радиуса; 3 — разность кривых 1 и 2

где $e^2/(a+c)\epsilon_p$ — энергия кулоновского взаимодействия иона радиуса a с фиксированным в стенке канала анионом радиуса c . Как видно из (XX.5.1) и показано на рис. XX.7, зависимость ΔW от ионного радиуса немонотонна и весьма чувствительна к размеру фиксированного аниона. Соответственно лучше всего связываются в канале ионы, для которых изменение свободной энергии минимально.

Порядок расположения катионов щелочных металлов в рядах селективности меняется в зависимости от предполагаемого радиуса анионного центра. Для самых больших анионных радиусов энергия кулоновского взаимодействия мала и определяющим фактором является взаимодействие катиона с водой. В этом случае сродство катиона к участкам связывания в мембране возрастает с увеличением ионного радиуса в ряду связывания: $\text{Cs} > \text{Rb} > \text{K} > \text{Na} > \text{Li}$.

Для самых малых анионных радиусов, наоборот, преобладает притяжение катиона к фиксированному отрицательному заряду аниона и тогда образуется ряд связывания, в котором катионы меньшего радиуса связываются прочнее, чем крупные: $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$. Существуют другие переходные ряды для промежуточных значений радиуса фиксированного отрицательного заряда.

В случае проникновения через канал органических катионов важен не только их размер, но и способность образовывать водородные связи. Так, из трех изостерических молекул — гидроксилamina, гидразина и метиламина — метиламин практически не проходит через Na^+ -канал, так как не образует водородных связей с атомами кислорода в выстилающих группировках канала.

§ 6. Ионные каналы нервных волокон

Среди различных ионных каналов биологических мембран наиболее полно охарактеризованы два основных типа каналов, содержащихся в нервных волокнах: Na^+ -каналы и K^+ -каналы.

Экспериментальные данные по транспорту ионов в Na^+ -канале адекватно описываются на основе двух различных моделей с отличающимися профилями энергии (рис. XX.8) (кривые 1 и 2). Входящий и выходящий потоки Na^+ в Na^+ -канале независимы; этот факт соответствует энергетическому профилю с высоким центральным барьером (кривая 1). Однако такая форма энергетического профиля не согласуется с данными о существовании в селективном центре Na^+ -канала фиксированной анионной группы, которое доказывается зависимостью проводимости Na^+ -каналов от pH среды. Протонирование кислотной группы (pK 5,2) приводит к блокированию Na^+ -канала. При физиологических значениях pH состоянию канала с депротонированной кислотной группой больше соответствует профиль, в котором центральный энергетический барьер расщеплен на два (рис. XX.8; кривая 2). В таком канале фиксированный анионный центр, притягивая катионы, облегчает их вход в канал. Однако тем самым одновременно затрудняется выход из основной потенциальной ямы, который может облегчиться, когда в боковом участке связывания появляется второй катион. Электростатическое отталкивание способствует выходу первого иона, и второй ион может заполнить центральную яму.

Согласно данным Б. Хилле, через Na^+ -канал могут проходить различные органические катионы, размеры которых не превышают $0,3 \times 0,5$ нм, что соответствует минимальному сечению поры. Размеры многих из проникающих ионов такие же, как у частично гидратированного иона Na (рис. XX.9).

Очевидно, ион Na может проходить через селективный фильтр, сохраняя в гидратной оболочке 1—3 молекулы воды.

Органические катионы, способные к проникновению через Na^+ -канал, не содержат метильной ($-\text{CH}_3$) или метиленовой ($-\text{CH}_2-$)-групп. Например, ионы гидроксиламмония ($\text{H}_3\text{N}^+-\text{OH}$) и метиламмония ($\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_3$) обладают одинаковыми размерами порядка $0,45 \times 0,38 \times 0,38$ нм. Однако Na^+ -канал оказывается проницаемым для гидроксиламмония и непроницаемым для метиламмония, в молекуле которого содержится CH_3 -группа. Возможно, что вдоль стенок поры расположены атомы кислорода, с которыми

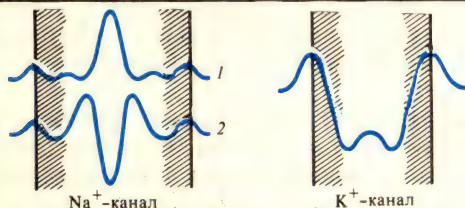


Рис. XX.8. Энергетические профили натриевого и калиевого каналов возбудимых мембран:

1 и 2 — альтернативные модели Na^+ -канала

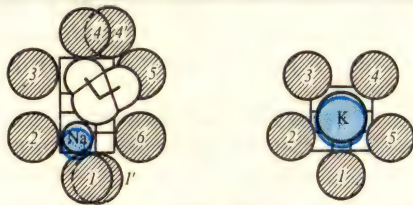


Рис. XX.9. Гипотетическая структура селективных фильтров Na^+ - и K^+ -каналов с находящимися внутри ионами (по Б. Хилле, 1975):

1, 1'— COO^- -группа, 2—6—атомы кислорода; масштабная сетка нанесена в десятых долях нанометра; в Na^+ -канале находится молекула воды

атом водорода OH -группы гидроксиламмония может образовывать сильную водородную связь, уменьшая тем самым эффективный размер иона. В результате обеспечивается прохождение всего иона через пору шириной только 0,3 нм. Водородные атомы метильной группы метиламмония не могут образовывать водородные связи, поэтому данная группа остается слишком большой по размеру и не проходит через пору.

Величины относительной проницаемости в Na- и K-каналах для ионов составляют соответственно: литий — 0,93; 0,02, таллий — 0,33; 2,3, метиламмоний — 0,007; 0,02.

Предполагаемый энергетический профиль для калиевого канала показан на рис. XX.8. Такой профиль соответствует условиям, когда наиболее медленной стадией транспорта является переход частиц через границу мембраны. Форма энергетического профиля предполагает также, что десорбция ионов замедлена относительно адсорбции из раствора. Подробный анализ модели с учетом указанных предположений показывает, что канал все время находится в заполненном двухчастичном состоянии. Поэтому выход частицы из канала в раствор сопровождается последовательным сдвигом ионов по всему каналу. А так как число ям в канале равно двум, то «порядок» реакции увеличивается вдвое. В этих условиях формула Уссинга [см. (XIX.2.12)] не соблюдается:

$$\bar{j}^+/\bar{j}^- = (c_i/c_o)e^{-2ZF\varphi/(RT)} = e^{2ZF(\varphi_0 - \varphi)/(RT)} = e^{2(\varphi_0 - \varphi)}, \quad (\text{XX.6.1})$$

где φ_0 — равновесный нернстовский потенциал. Появление e^2 в отношении односторонних потоков соответствует удвоению порядка реакции при переносе иона через канал.

Эмпирический коэффициент n , появляющийся в так называемой обобщенной формуле Уссинга (для K^+ -канала $n=2$)

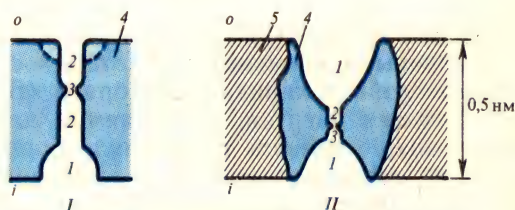
$$\bar{j}^+/\bar{j}^- = e^{nZF(\varphi_0 - \varphi)/(RT)} \quad (\text{XX.6.2})$$

по данным разных исследователей, варьирует в пределах 1,5—2,5, что хорошо согласуется с теоретической моделью. Теория показывает, что число n в обобщенной формуле Уссинга имеет смысл среднего числа ионов в канале.

Калиевые каналы содержат широкое устье со стороны цитоплазмы. Это устье может блокироваться тетраэтиламмонием и более крупными его производными, такими, как пентилтриэтиламмоний и нонилтриэтиламмоний (рис. XX.10). Эффективность блокаторов возрастает с ростом длины гидрофобной углеводородной цепи. Если повысить наружную концентрацию K^+ , входящий поток K^+ как бы выталкивает крупные катионы блокаторов во

Рис. XX.10. Калиевые каналы аксона (I) и саркоплазматического ретикулума (II):

1—широкое устье диаметром около 1 нм, 2—узкая часть поры, 3—критическое сужение (селективный фильтр), пунктиром показан возможный внешний участок связывания тетраэтиламмония, 4—белковый компонент, 5—липидный бислой, o, i —соответственно внешняя и внутренняя стороны мембран



внутренний раствор, в результате чего ускоряется выход каналов из заблокированного состояния. Высокая эффективность ионов-блокаторов с длинной гидрофобной цепью свидетельствует о наличии в устье канала гидрофобных участков. Для того чтобы ионы тетраэтиламмония и нонилтриэтиламмония могли входить в пору, диаметр устья должен быть не менее 0,8 нм. Узкая часть поры проницаема для ионов с размерами от 0,26 до 0,3 нм и непроницаема как для меньших, так и для больших ионов. Ионы, размер которых больше 0,3 нм, не могут проходить через пору по стерическим причинам. Ионы, размер которых меньше 0,26 нм, недостаточно эффективно взаимодействуют с атомами О, которые расположены в стенках поры (см. рис. XX.9). Ион К эффективно взаимодействует со всеми атомами О, расположенными в стенках поры, и его энергия в поре незначительно больше, чем в воде. Ион Na эффективно связывается только с двумя атомами О в селективном фильтре, другие атомы не могут подойти к Na^+ из-за жесткости стенок поры. По этой причине потенциальная энергия Na^+ значительно выше, чем в воде, и ион не проходит через селективный фильтр K^+ -канала. В целом K^+ -каналы лучше различают ионы, чем Na-каналы.

Проводимость одиночного K^+ -канала в аксонах кальмара составляет около 10 пСм. В мембранах саркоплазматического ретикулума обнаружены высокоспецифичные K^+ -каналы, проводимость которых почти на порядок выше и составляет 130 пСм. Предполагаемое строение таких каналов показано на рис. XX.10, II. Диаметр широкого устья каналов составляет не менее 1 нм. Узкая часть поры имеет диаметр около 0,7 нм и длину 1 нм. В узкой части канала находится селективный фильтр с диаметром пропускного отверстия 0,4—0,5 нм. Представляется вероятным, что K^+ -каналы с низкой и высокой проводимостью построены по общей схеме, т. е. имеют широкое устье, в котором происходит свободная диффузия ионов, узкую цилиндрическую часть поры, на которой в основном падает трансмембранная разность потенциалов, и селективный фильтр. Различие в проводимостях K^+ -каналов двух типов может быть обусловлено лишь различной длиной узкой части канала.

Глава XXI

Индукцированный ионный транспорт



§ 1. Бислойные липидные мембраны

Основные закономерности транспорта ионов через мембраны изучены в опытах с различными моделями, из которых самой близкой к биомембранам оказалась бислойная липидная мембрана (БЛМ) (см. § 2 гл. XV).

Затраты энергии, необходимые для проникновения иона в неполярную фазу, можно оценить по формуле Борна [см. (XVIII.2.3)], согласно которой энергия, затрачиваемая на перемещение иона из воды в мембрану, зависит от его радиуса (r) и диэлектрических проницаемостей воды (ϵ_w) и мембраны (ϵ_m):

$$W = [z^2 e^2 / (2r)] (1/\epsilon_m - 1/\epsilon_w), \quad (\text{XXI.1.1})$$

где z — валентность иона, e — элементарный заряд. Рассчитанные по данному уравнению значения свободной энергии для перехода K^+ и Na^+ из воды в неполярный растворитель с $\epsilon_m = 2$ составляют большую величину (250—350 кДж/моль). Именно это создает барьер, препятствующий прохождению ионов щелочных металлов через гидрофобную часть липидного бислоя в негидратированной форме.

Как видно из (XXI.1), энергия перехода иона в мембрану снижается с увеличением радиуса иона. Поэтому крупные органические ионы проникают через БЛМ легче, чем катионы щелочных металлов. Для таких крупных линофильных ионов, как дипикриламид и тетрафенилбор, возможно прямое прохождение через мембрану. При изменении градиента концентрации в случае одного проникающего иона разность электрических потенциалов на БЛМ изменяется в соответствии с уравнением Нернста. Этим методом было продемонстрировано пассивное движение проникающих ионов через мембраны митохондрий, субмитохондриальных частиц, бактериальных хромофоров при энергозависимой генерации мембранного потенциала (см. гл. XXIV).

Как видно из (XXI.1.1), величина энергетического барьера в мембране уменьшается, а следовательно, проницаемость мембраны для иона возрастает не только при увеличении его радиуса, но и при приближении значений ϵ_m к ϵ_w . На этих физических принципах и основан перенос ионов ионофорами. Ионофоры могут образовывать с ионом комплекс большого размера — переносчики — либо формировать пору в мембране, заподненную водой, — каналы. Эти механизмы переноса — с участием переносчиков и через ионные каналы — изучены наиболее подробно в опытах с БЛМ.

§ 2. Подвижные переносчики

Перенос иона через мембрану с участием переносчика включает стадии образования комплекса иона с ионофором на одной стороне мембраны, перемещения комплекса через мембрану, освобождения иона на другой стороне и воз-

вращения ионофора. Возможны две схемы работы переносчика: малая «карусель», когда ионофор не выходит из мембраны, и большая «карусель», когда ионофор проходит мембрану насквозь, а образование и распад комплексов протекает в перемешиваемых слоях около мембраны. По механизму малой карусели осуществляется, например, перенос K^+ в присутствии валиномицина.

Энергию комплекса иона радиусом r с переносчиком радиусом b в мембране с диэлектрической проницаемостью ϵ_m можно записать на основании формулы Борна (рис. XXI.1):

$$W = e^2 / (2\epsilon_m b) + [e^2 / (2\epsilon_k)] (1/r - 1/b), \quad (XXI.2.1)$$

где ϵ_k — эффективная диэлектрическая проницаемость внутренней сферы комплексона. Энергия комплекса ион—переносчик оказывается значительно меньше энергии дегидратированного иона. Так, для заряженного комплекса радиусом 1 нм свободная энергия перехода из воды в мембрану составляет около 15 кДж/моль в отличие от значений 250—350 кДж/моль, соответствующих энергии дегидратации свободных ионов с радиусом 0,1—0,15 нм.

Среди соединений, относящихся к ионным переносчикам, центральное место занимают макроциклические антибиотики, выделенные из микроорганизмов, и ряд синтетических макроциклических комплексонов (Ю. А. Овчинников, А. М. Шкроб, В. Т. Иванов). Некоторые соединения из этой группы — нейтральные ионофоры — не содержат ионизируемых групп. Это циклические полипептиды, циклические молекулы, состоящие из чередующихся аминокислот и α -оксикислот (так называемые депсипептиды, примером которых являются валиномицин и его аналоги), макроциклические структуры, включающие четыре лактоновых кольца, — макротетролиды (нонактин) — и некоторые синтетические циклические полиэфиры. Комплексы, образуемые нейтральными макроциклическими соединениями с ионами щелочных металлов, несут положительный заряд. Перенос иона через мембрану происходит в виде заряженного комплекса.

Рентгеноструктурный анализ таких комплексов показывает, что катион входит во внутреннюю полость молекулы ионофора, причем образовавшаяся структура стабилизируется за счет взаимодействия иона с 6—8 полярными группировками (эфирные, амидные или сложноэфирные). В таких комплексах ион металла экранирован от взаимодействия с растворителем. Химическое строение молекулы валиномицина показано на рис. XXI.2. Высокая избирательность валиномицина к образованию комплексов с K^+ достигается хорошим стерическим соответствием K^+ и внутренней полости валиномицина, которую образуют СО-группы. Валиномицин, комплексуясь с K^+ , полностью его дегидратирует, а карбонильные (CO—) диполи заменяют гидратную оболочку. Ион Na может поместиться в полости валиномицина, однако вследствие меньшего (по сравнению с K^+) радиуса он оказывается не в состоянии взаимодействовать с кислородом карбонильных групп. Поэтому энергия связывания иона Na с водой гидратной оболочки оказывается больше энергии его связывания с молекулой валиномицина. Если бы молекула валиномицина была

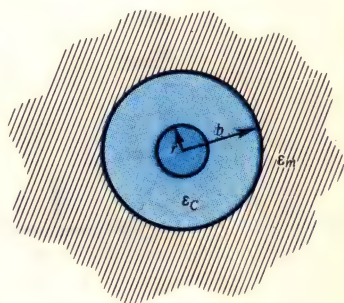


Рис XXI.1. К расчету электростатической энергии комплекса ион—переносчик:

ϵ_m — диэлектрическая постоянная мембраны, ϵ_k — эффективная диэлектрическая постоянная внутренней полости комплексона, r — радиус иона, b — радиус комплекса ион—переносчик

достаточно гибкой и размер полости можно было бы «подстроить» под Na^+ , то валиномицин не обладал бы хорошей селективностью. Молекула валиномицина переносит через БЛМ не более 10^4 ионов/с.

Некоторые ионофоры, такие, как нигерицин и гризорицин, формально имеют нециклическое строение, но они также способны связывать ионы металлов, образуя комплексы, в которых молекула находится в свернутой, псевдо-

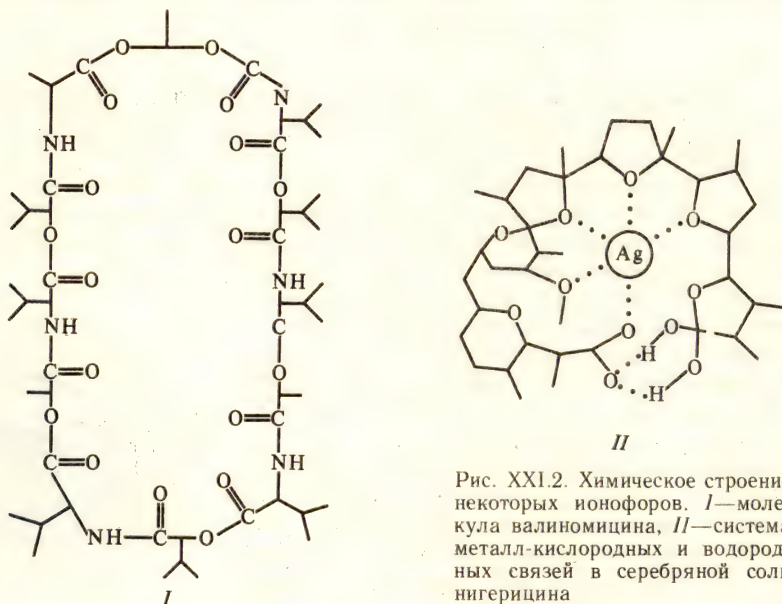


Рис. XXI.2. Химическое строение некоторых ионофоров. I—молекула валиномицина, II—система металл-кислородных и водородных связей в серебряной соли нигерицина

циклической конформации. В нигерицине и его аналогах присутствует COOH -группа, ионизированная при нейтральных значениях pH. Предполагаемое строение комплекса катиона с нигерицином также показано на рис. XXI.2.

Будучи слабыми кислотами и одновременно обладая способностью образовывать комплексы с ионами металлов, нигерицин и его аналоги переносят через мембрану сразу два типа ионов, а при наличии градиента ионов индуцируют обменный транспорт (см. § 3 гл. XXIV). Так, нигерицин индуцирует в БЛМ и биологических мембранах обмен H^+ на K^+ . В растворе с высоким содержанием протонов нигерицин протонируется и в форме нейтральной недиссоциированной молекулы пересекает мембрану. На другой стороне мембраны происходит депротонирование COOH -группы нигерицина; при этом молекула свертывается в кольцо вокруг K^+ . Стабильная конфигурация образуемого комплекса поддерживается взаимодействием катиона с дипольными частями ионофора и водородными связями между его противоположными концами (рис. XXI.2). Переносчики двухвалентных катионов X537 и A23187 индуцируют электронейтральный обмен Ca^{2+} и Mg^{2+} на протоны.

Рассмотренные выше варианты работы переносчиков показаны на рис. XXI.3, здесь же изображен механизм переноса H^+ липофильными проводниками протонов. Перенос протонов через мембрану осуществляется в основном слабыми кислотами, диссоциированная форма которых присоединяет H^+ с образованием нейтральной молекулы. Недиссоциированная форма протонифора пересекает мембрану, двигаясь по градиенту концентрации;

перенос отрицательно заряженной анионной формы в обратном направлении происходит под действием электрического поля. По такому механизму работают, видимо, разобщители окислительного и фотосинтетического фосфорилирования, повышающие проницаемость БЛМ и энергосопрягающих мембран для H^+ , такие, как 2,4-динитрофенол, карбонилцианидхлорфенилгидразон, тетрахлортрифторметилбензимидазол и др. (рис. XXI.4).

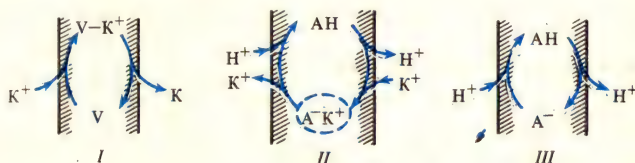


Рис. XXI.3. Индуцированный транспорт ионов при участии различных переносчиков, *I*—нейтральные ионофоры (валиномицин), *II*—нигерицин (обменный транспорт H^+ и K^+); *III*—липофильные разобщители фосфорилирования (перенос протонов):

A^- —диссоциированная форма переносчика, AH —протонированная форма переносчика, V —валиномицин

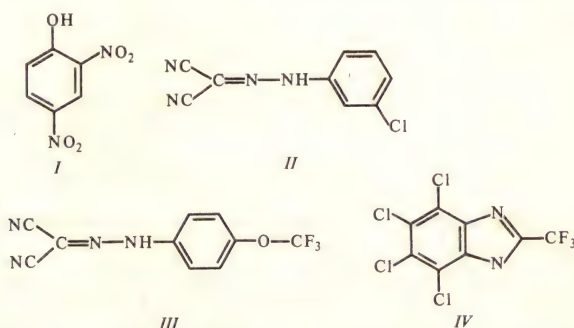


Рис. XXI.4. Химическое строение некоторых липофильных переносчиков протонов. *I*—2,4-динитрофенол; *II*—карбонилцианидхлорфенилгидразон; *III*—карбонилцианидтрифторметоксифенилгидразон; *IV*—тетрахлортрифторметилбензимидазол (TTFB)

§ 3. Каналообразующие агенты

Движение иона значительно облегчается, если молекулы ионофора образуют комплекс, имеющий водную пору — канал. Наиболее известными каналообразующими соединениями являются грамицидин *A*, аламетицин, амфотерицин, моназомицин и полиеновые антибиотики.

Все эти молекулы обладают сродством к водной и органической фазам, что, с одной стороны, позволяет им образовывать водную пору, а с другой — приводит к сильной сорбции антибиотика на мембрану. Внешняя часть молекул в поре гидрофобна, а внутрь канала обращены хорошо поляризуемые группы.

Заряженные или сильно полярные группы могут находиться на одном конце молекулы. Такие группы служат «якорем», удерживая полярный конец на одной из сторон мембраны, позволяя молекуле пронизать гидрофобную часть мембраны.

Ионные каналы в БЛМ экспериментально можно обнаружить по характерному шуму проводимости, возникающему вследствие их открывания и за-

крывания (см. § 5 гл. XXI). Эта черта функционирования каналов позволяет отличить данный механизм проводимости от транспорта с участием переносчиков.

Каналы, образованные грамицидином А. Пептидная цепь молекулы грамицидина А сформирована пятнадцатью гидрофобными аминокислотами (рис. XXI.5), причем характерной чертой является чередование L- и D-конфигураций аминокислот, а также наличие формильной группы на N-конце молекулы (голова) и этаноламина на С-конце (хвост). Молекула полностью

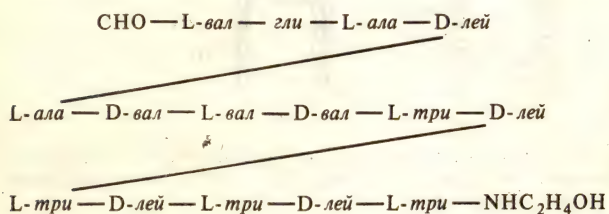


Рис. XXI.5. Структура грамицидина А. Каждый горизонтальный ряд аминокислот соответствует примерно одному повороту π^6_{LD} -спирали, диагональные линии — пептидными связям, соединяющим отдельные витки спирали

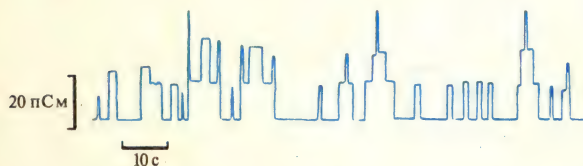


Рис. XXI.6. Записи тока через одиночные каналы, образованные в БЛМ грамицидином А

гидрофобна, за исключением карбонильных и иминогрупп пептидной цепи и концевых полярных групп.

Находясь в мембране, молекула грамицидина А сворачивается в спиралевидную структуру — полупору, стабилизированную гидрофобными связями, и формирует полый цилиндр длиной около 3 нм и диаметром поры около 0,5—0,8 нм. Такая структура называется π^6_{LD} -спиралью. Название определяется тем, что каждый виток спирали образован шестью аминокислотными остатками, причем СО-группы L-аминокислотных остатков ориентированы вдоль оси спирали по направлению к С-концу, а соответствующие группы D-остатков и глицина — к N-концу.

При добавлении небольших количеств грамицидина А к БЛМ наблюдаются скачкообразные изменения тока через мембрану. При фиксированном значении напряжения на БЛМ происходят дискретные изменения проводимости мембран примерно равной величины (рис. XXI.6). Они могут быть вызваны, например, образованием и распадом одиночных каналов при ассоциации двух мономеров и диссоциации димера грамицидина. Димерная структура образует сквозной трансмембранный канал с проводимостью около 40 пСм в 0,1 М растворе KCl. По такому каналу может переноситься около 10^7 — 10^8 ионов/с.

Причины переходов между проводящим и непроводящим состояниями канала могут быть различны. Альтернативный механизм открывания грамицидиновых каналов показан на рис. XXI.7.

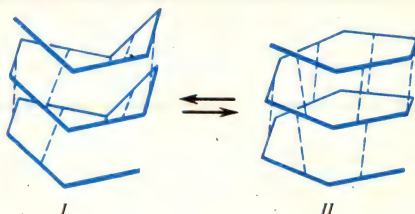
Относительно низкая селективность грамицидинового канала может быть следствием эластичности спиральной структуры. При входе иона в канал вода гидратной оболочки частично замещается на карбонильные группы, обращенные внутрь поры. При этом происходит некоторое смещение карбонильных

групп по направлению к оси спирали, в результате чего диаметр поры сужается примерно до размера иона. Таким образом обеспечивается наиболее сильное взаимодействие катиона с лигандной системой канала.

Грамицидин — крайне эффективный модификатор БЛМ. В субмикромольных концентрациях он повышает проводимость в 10^6 — 10^8 раз по отношению к уровню проводимости немодифицированных мембран.

Аламетицин. Это пептидный антибиотик, состоящий из 20 преимущественно гидрофобных аминокислот, объединенных в линейную цепь. Проводи-

Рис. XXI.7. Равновесие анти- β_2^6 (I) и $\pi_{L,D}^6$ -спиралей (II) грамицидина А; пунктиром обозначены водородные связи (по Д. В. Урри, 1975)



Предполагают, что $\pi_{L,D}^6$ -спираль может находиться в равновесии с другой структурой — так называемой анти- β_2^6 -спиралью. В анти- β_2^6 -спирали нет внутренней полости, и поэтому она не может вмещать ионы металлов. Так как анти- β_2^6 -спираль имеет меньший дипольный момент, чем $\pi_{L,D}^6$ -спираль, то равновесие между этими формами может смещаться в ту или другую сторону под влиянием внешнего электрического поля

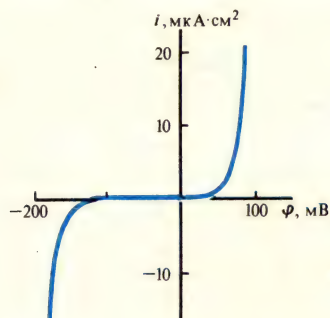


Рис. XXI.8. Зависимость проводимости БЛМ (в присутствии аламетицина) от значения мембранного потенциала (ϕ): i — ток через мембрану

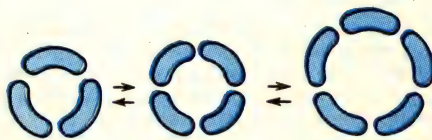


Рис. XXI.9. Сборка аламетицинового канала
Показаны различные состояния канала, соответствующие тримеру, тетрамеру и пентамеру из молекул аламетицина

мость БЛМ, находящихся в водном растворе, в присутствии аламетицина резко зависит от концентраций антибиотика и электролита и от значения мембранного потенциала (рис. XXI.8).

Установлено, что каждый канал, образуемый аламетицином, может иметь несколько (до семи) состояний проводимости. Предполагают, что канал представляет собой водную пору переменного диаметра. Добавление одной молекулы аламетицина в кольцо молекул, образующих водную пору, приводит к увеличению эффективного сечения поры, а каждому состоянию канала соответствует определенное количество мономеров в кольце. Первое проводящее

состояние обусловлено тримером из молекул аламетицина, второе — тетрамером и т. д. (рис. XXI.9).

Состояние канала характеризуется не только величиной проводимости, но и средним временем жизни. Если переходы между открытым и закрытым состояниями канала являются случайными, т. е. представляют собой марковский процесс, то зависимость числа каналов, время жизни которых превышает заданное время t , $N(t)$, от значения параметра t в полулогарифмических координатах спрямляется (рис. XXI.10).

Среднее время жизни канала τ_0 определяется уравнением

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau_0}. \quad (\text{XXI.3.1})$$

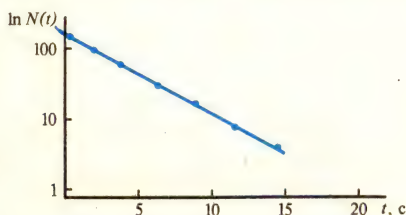


Рис. XXI.10. Распределение времен жизни амфотерициновых каналов:

$N(t)$ — число каналов, находящихся в открытом состоянии в течение большего времени, чем заданное значение t

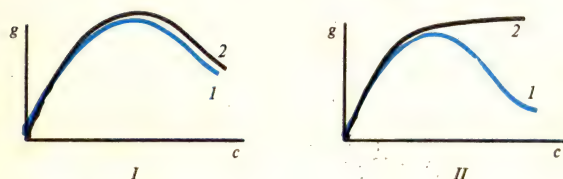


Рис. XXI.11. Концентрационные зависимости проводимости БЛМ на постоянном (I) и переменном (II) токе в случае транспорта по каналному механизму (I) и с участием подвижных переносчиков (2)

Два механизма ионного транспорта (каналы и переносчики) можно различать по концентрационным зависимостям проводимости на переменном токе, более информативным, чем измерения на постоянном токе. Например, зависимость проводимости на постоянном токе от концентрации переносимого иона как для транспорта с переносчиком, так и по каналному механизму носит немонотонный куполообразный характер. Это объясняется блокировкой каналов при высоких концентрациях транспортируемого иона. В случае подвижных переносчиков снижение скорости переноса при высоких концентрациях обусловлено отсутствием свободной формы ионофора, так как весь ионофор находится в виде комплекса с катионом.

На переменном токе зависимости проводимости БЛМ для двух разных механизмов переноса отличаются. При высоких концентрациях электролита входные участки каналов заполнены, перескоки через центральный барьер невозможны и проводимость канала на переменном токе остается низкой. В то же время заряженные комплексы переносчика с катионом и на высокой частоте могут переносить ток через мембрану, благодаря чему проводимость БЛМ с переносчиком остается высокой

Величина τ_0 связана с константой скорости перехода канала из открытого в закрытое состояние α соотношением $\alpha = 1/\tau_0$.

Дискретные изменения проводимости регистрируются лишь в том случае, когда проводимость мембраны сопоставима с проводимостью одиночного канала, т. е. при крайне малых концентрациях антибиотика. При высокой степени модификации мембраны антибиотиками ее проводимость на несколько порядков превышает проводимость одиночного канала и дискретные изменения проводимости неизмеримы. Тем не менее существует возможность отли-

чить механизмы переноса с участием подвижных переносчиков и по ионным каналам по измерениям интегральной проводимости.

Один из подходов состоит в том, что мембрану охлаждают до температуры ниже точки фазового перехода липида (см. § 1 гл. XVI). При этом проводимость БЛМ, индуцированная подвижными переносчиками — валиномицином или нонактином, — значительно уменьшается, а проводимость, индуцированная грамицидином, почти не изменяется. Увеличение вязкости мембраны при понижении температуры препятствует движению подвижных переносчиков, но оказывает относительно слабое влияние на транспорт ионов через канал, пронизывающий мембрану насквозь. Другой подход состоит в сравнении проводимости мембран на переменном токе (рис. XXI.11).

§ 4. Влияние поверхностного и дипольного потенциалов на скорость ионного транспорта

Проводимость мембран, индуцированная нейтральными ионофорами-переносчиками, существенно изменяется при введении в водные растворы заряженных поверхностно-активных веществ и дипольных модификаторов. Это объясняется тем, что движение заряженных комплексов ион—переносчик через БЛМ и клеточные мембраны существенным образом зависит от скачков потенциала на границе мембраны с электролитом, называемых граничными потенциалами.

Граничный потенциал (рис. XXI.12) складывается из двух компонентов — поверхностного потенциала φ_s и дипольного потенциала φ_d :

$$\varphi_b = \varphi_s + \varphi_d. \quad (\text{XXI.4.1})$$

Поверхностный потенциал обусловлен фиксированными зарядами мембраны, образованными диссоциируемыми группами в полярных головках липи-

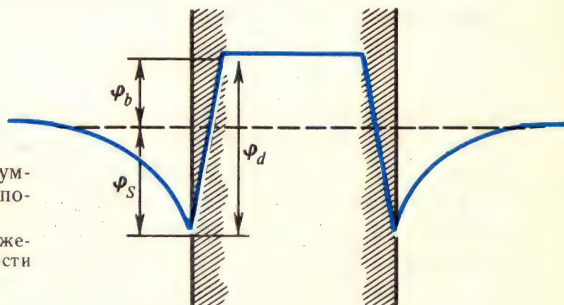


Рис. XXI.12. Граничный потенциал (φ_b) как сумма поверхностного (φ_s) и дипольного (φ_d) потенциалов

Мембрана находится в симметричном ионном окружении при отсутствии внешне приложенной разности потенциалов

дов, а также ионизируемыми группами аминокислот, входящих в состав структурных белков мембраны. Фиксированные на поверхности мембраны заряды и притягивающиеся к ним противоионы образуют двойной электрический слой (см. § 5 гл. XVIII).

Плотность фиксированных зарядов мембраны (σ) обычно находится в пределах от 0 до 5 мКл/см² и зависит от состава липидов и pH среды (см. § 1, 2 гл. XV). Отрицательный заряд мембран возрастает с увеличением pH среды.

Плотность зарядов мембраны изменяется также в результате адсорбции на мембране катионных и анионных детергентов, например цетилтриметиламмония или додецилсульфата, а также многовалентных ионов (Ca, La, Al, многовалентные анионы).

Дипольный скачок потенциала образован ориентированными диполями воды и полярных групп липидных молекул. На основании измерений граничного потенциала монослоев различных липидов был сделан вывод, что гидрофобная область БЛМ заряжена положительно по отношению к потенциалу водных растворов у границы с мембраной. Принято считать, что в отличие от поверхностного потенциала дипольный потенциал не зависит от pH и ионной силы водного раствора.

Дипольный потенциал можно менять, вводя в БЛМ различные вещества — дипольные модификаторы, электронейтральные молекулы которых обладают значительным дипольным моментом. Поверхностный и дипольный потенциал относятся к одним из основных факторов, определяющих проницаемость липидных бислоев для проникающих ионов и заряженных комплексов ион — переносчик. Значение поверхностного потенциала определяет равновесную концентрацию ионов в мембране на границе с раствором:

$$c_m = \gamma c e^{-zF\varphi_s/(RT)}, \quad (XXI.4.2)$$

где γ — коэффициент распределения иона или заряженного комплекса между мембраной и водой. Если поверхностный потенциал отрицателен, что характерно для большинства клеточных мембран и многих БЛМ, то примембранная концентрация катионов повышена, а соответственно повышена и концентрация анионов в мембране на границе с раствором.

Значение дипольного потенциала определяет в качестве одной из составляющих высоту потенциального барьера для перехода заряженных частиц в мембрану. Так как проводимость мембраны (g) пропорциональна произведению равновесной концентрации заряженных частиц в мембране у границы с раствором на константу скорости их перемещения через мембрану (v), то с учетом (XXI.4.2) получаем простую формулу, описывающую зависимость проводимости от граничного потенциала:

$$g = \gamma c e^{-zF\varphi_s/(RT)} v_0 e^{-zF\varphi_d/(RT)} = g_0 e^{-zF\varphi_b/(RT)} \quad (XXI.4.3)$$

Валентность z в (XXI.4.3) относится к заряду транспортируемого иона в случае прямого прохождения иона и к заряду комплекса ион — переносчик в случае индуцированного ионного транспорта.

Из уравнения (XXI.4.3) видно, что увеличение отрицательного поверхностного потенциала (при неизменном значении дипольного потенциала) должно сопровождаться увеличением проводимости БЛМ, индуцируемой положительно заряженными комплексами ион — переносчик. Экспериментальное исследование зависимости проводимости БЛМ, индуцированной положительно заряженным ионофорным комплексом нонактин — калий, полностью подтверждает это предположение. Так как заряд БЛМ образуется в результате диссоциации кислотных и основных групп головок фосфолипидов, то он меняется в зависимости от pH, что приводит к росту проводимости с увеличением pH в присутствии нонактина. В соответствии с формулой (XXI.4.3) проводимость заряженных БЛМ, индуцируемая нонактином, при нейтральных и щелочных значениях pH снижается с увеличением ионной силы, что вызвано экранированием поверхностного заряда, уменьшением значения φ_s и соответствующим снижением равновесной концентрации положительно заряженных носителей тока в мембране (рис. XXI.13).

Изменение проводимости БЛМ при адсорбции на ней заряженных детергентов и ионов многовалентных металлов также объясняется изменением поверхностного потенциала БЛМ.

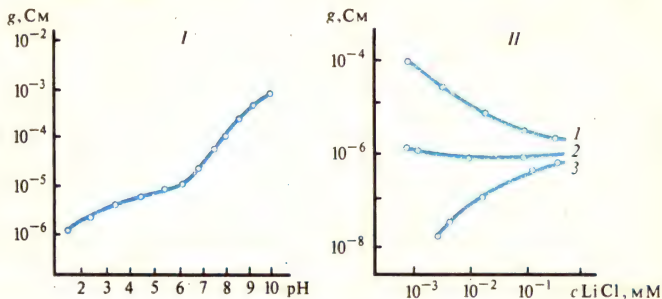


Рис. XXI.13. Влияние поверхностного заряда на индуцированную неактивную проводимость БЛМ (g):

I—влияние pH на проводимость БЛМ из амфотерного фосфатидилэтанолamina, II—влияние ионной силы на проводимость БЛМ из фосфатидилэтанолamina при различных pH (1—10,9; 2—5,5; 3—2,4)

§ 5. Флуктуации проводимости мембран

Электрические флуктуации в мембранах обусловлены изменением числа открытых каналов вследствие случайных процессов их формирования и распада. Анализ флуктуаций проводимости позволяет оценить две основные характеристики канала: среднее время жизни канала в открытом состоянии и проводимость одиночного канала.

Если каналы в мембране открываются и закрываются независимо, то изменения проводимости мембраны представляют собой стохастический процесс. Значения проводимости (g) колеблются около некоторого среднего значения (\bar{g}) с дисперсией σ^2 или среднеквадратичным отклонением σ :

$$\sigma^2 = \langle (g - \bar{g})^2 \rangle \quad (\text{XXI.5.1})$$

(рис. XXI.14). Анализ этого процесса проводят с помощью функций корреляции [см. (XI.1.9) — (XI.1.15)].

Величина временного интервала, через который $g(t + \tau)$ перестает коррелировать с $g(t)$, является мерой скорости, характеризующей затухание корреляции. Временная зависимость случайных флуктуаций может быть охарактеризована так называемой автокорреляционной функцией, которая определяется

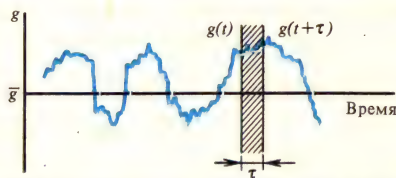


Рис. XXI.14. Изменение проводимости мембраны как функция времени

Если значение проводимости мембраны в момент t равно $g(t)$, то через небольшой промежуток времени значение проводимости $g(t + \tau)$ будет иметь близкую величину; иначе говоря, величина в момент времени $(t + \tau)$ будет «коррелировать» с величиной в момент времени t . Однако через достаточно большой промежуток времени уже невозможно предсказать величину $g(t + \tau)$, основываясь на ее первоначальной величине $g(t)$, т. е. $g(t + \tau)$ и $g(t)$ становятся полностью независимыми

как среднее от произведения флуктуирующей величины $g(t)$ в момент времени t на ее значение через промежуток времени τ [см. (XI.1.9)]:

$$C(\tau) = \langle g(t)g(t+\tau) \rangle. \quad (\text{XXI.5.2})$$

Для простоты обычно полагают, что значение проводимости флуктуирует вокруг нуля (т. е. проведено вычитание среднего значения). Значение авто-

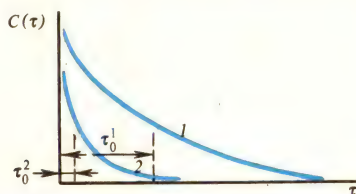


Рис. XXI.15. Автокорреляционные функции, соответствующие медленным (1) и быстрым (2) флуктуациям:

τ_0 — характерное время экспоненты, совпадающее со средним временем жизни канала в открытом состоянии

корреляционной функции при $\tau=0$, по определению, равно дисперсии флуктуирующего сигнала σ^2 [см. (XI.1.11)]. Оно всегда больше нуля, поскольку для $\tau=0$ все усредняемые произведения являются квадратами и, следовательно, положительны. Однако при увеличении τ часть усредняемых произведений будет положительна, а часть — отрицательна. Поэтому при достаточной величине τ суммирование таких произведений приведет к их компенсации. Следовательно, функция $C(\tau)$ уменьшается и приближается к нулю, если τ становится очень большим по сравнению со средним временем флуктуаций.

Шумы процессов открывания — закрывания каналов. Предположим, что в мембране существует большое число статистически независимых каналов, которые открываются и закрываются по принципу «все или ничего» и остаются открытыми в течение промежутков времени, малых по сравнению с временами их жизни в закрытом состоянии. Если времена их открытого состояния распределены экспоненциально со средним временем τ_0 [см. (XXI.3.1)], то автокорреляционная функция оказывается простой экспоненциальной функцией [см. (XI.1.13)] с постоянной времени τ_0 и начальной амплитудой σ^2 (рис. XXI.15):

$$C(\tau) = \sigma^2 \exp(-\tau/\tau_0). \quad (\text{XXI.5.3})$$

Величина σ^2 связана с проводимостью одиночного канала h_0 и средним значением проводимости $\langle g \rangle$ простым соотношением

$$\sigma^2 / \langle g \rangle = h_0, \quad (\text{XXI.5.4})$$

которое может быть получено из рассмотрения статистического характера включения и отключения независимых каналов в мембране при условии, что вероятность нахождения канала в открытом состоянии очень мала ($p \ll 1$). Как видно из (XXI.5.3) и (XXI.5.4), выражение для автокорреляционной функции может быть записано в виде

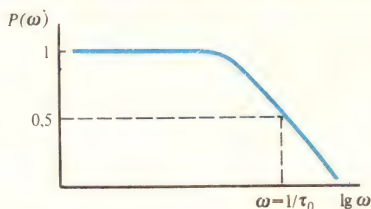
$$C(\tau) = h_0 \langle g \rangle \exp(-\tau/\tau_0). \quad (\text{XXI.5.5})$$

Автокорреляционная функция связывает величину флуктуаций σ^2 со значением проводимости одиночного канала h_0 и позволяет найти среднее время жизни канала в открытом состоянии по среднему времени флуктуаций. Типичные значения h_0 для различных каналов биологических и искусственных мембран лежат в пределах от 4 до 140 пСм. Времена жизни (τ_0) также варьируют в широких пределах (от миллисекунд до секунд); для грамицидина А $\tau_0 = 0,23$ с.

Фурье-образ, или энергетический спектр, связан с автокорреляционной функцией соотношением (XI.1.15):

$$P(\omega) = (2/\pi) \int_0^{\infty} C(\tau) \cos(\omega\tau) d\tau. \quad (\text{XXI.5.6})$$

Рис. XXI.16. Зависимость спектральной плотности флуктуаций от частоты беспорядочного процесса



Энергетический спектр (распределение спектральной плотности флуктуаций) $P(\omega)$ имеет вид кривой Лоренца [ср. (XIII.3.16)]. Спектральная плотность флуктуаций представлена как функция логарифма частоты. Спектр флуктуаций — прямая линия на частотах от нуля до частоты порядка $1/\tau_0$, линия резко идет вниз в области частот $\sim 1/\tau_0$. Видно, что беспорядочный процесс является эффективным широкополосным источником частот вплоть до частоты $1/\tau_0$.

Энергетический спектр характеризует распределение энергии флуктуаций как функцию частоты и может быть измерен в эксперименте с помощью частотных анализаторов (рис. XXI.16). Если автокорреляционная функция имеет вид, даваемый уравнением

$$C(\tau) = C_0 e^{-\tau/\tau_0}, \quad (\text{XXI.5.7})$$

то можно вычислить энергетический спектр:

$$P(\omega) = \frac{2}{\pi} C_0 \int_0^{\infty} e^{-\tau/\tau_0} \cos(\omega\tau) d\tau; \quad P(\omega) = \frac{2}{\pi} C_0 \frac{\tau_0}{1 + \omega^2 \tau_0^2}. \quad (\text{XXI.5.8})$$

В экспериментах на БЛМ результаты измерений интенсивности шума на данной частоте f ($f = 2\pi\omega$) выражают обычно в форме безразмерных единиц $\epsilon(f)$:

$$\epsilon(f) = \frac{S_{Vn}(f) - S_{Ve}(f)}{S_{Ve}(f)}, \quad (\text{XXI.5.9})$$

где $S_{Vn}(f)$ — интенсивность флуктуаций напряжения (V) на частоте f при пропускании через мембрану постоянного электрического тока (неравновесное состояние — n), а $S_{Ve}(f)$ — интенсивность флуктуаций напряжения в отсутствие тока (равновесное состояние — e). Величина $\epsilon(f)$ не зависит ни от степени модификации мембраны антибиотиком, ни от площади мембраны и поэтому удобна для сравнения результатов, полученных на разных мембранах с разным электрическим сопротивлением.

Тепловой шум. Для систем, находящихся в термодинамическом равновесии, флуктуации напряжения связаны с импедансом системы теоремой Найквиста (1928):

$$S_{Ve}(f) = 4k_B T \operatorname{Re} Z(f). \quad (\text{XXI.5.10})$$

В этом выражении $Z(f)$ — импеданс, т. е. комплексное сопротивление системы для переменного тока, включающее действительную и мнимую части:

$$Z = R_s + iX_s = \text{Re}Z + i\text{Im}Z,$$

где $R_s = \text{Re}Z$ — активное сопротивление (действительная часть импеданса), а $X_s = \text{Im}Z$ — реактивное сопротивление (мнимая часть импеданса).

Теорема Найквиста описывает спектральную плотность теплового шума в проводниках, обусловленного тепловым движением заряженных частиц. Для мембран, эквивалентная схема которых обычно изображается в виде параллельного соединения сопротивления R и емкости C , зависимость реальной части импеданса от частоты описывается соотношением

$$\text{Re} Z = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} = \frac{R}{1 + 4\pi^2 f^2 C R^2}. \quad (\text{XXI.5.11})$$

Соотношение (XXI.5.11) выводится из условия, что суммарная проводимость для параллельной цепи $(1/Z)$ равна сумме проводимости активного сопротивления $(1/R)$ и проводимости конденсатора:

$$1/Z = 1/R + i[1/(\omega C)] = 1/R + i\omega C.$$

Отсюда следует, что

$$Z = \frac{R}{1 + i\omega CR} = \frac{R(1 - i\omega CR)}{1 + \omega^2 C^2 R^2} = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} - \frac{\omega CR^2}{1 + \omega^2 C^2 R^2}.$$

В полученном выражении импеданс представлен в виде суммы его действительной (активная) и мнимой (реактивная) составляющих. Учитывая (XXI.5.11), формулу (XXI.5.10) можно записать в виде

$$S_{Ve}(f) = \frac{4k_B T R}{1 + 4\pi^2 (RCf)^2}. \quad (\text{XXI.5.12})$$

В режиме фиксации потенциала, когда измеряются флуктуации тока I , соответствующая спектральная плотность будет иметь вид

$$S_I(f) = 4k_B T / R. \quad (\text{XXI.5.13})$$

Таким образом, флуктуации тока, обусловленные тепловым шумом, не зависят от частоты. По этой причине тепловой шум часто называют «белым» шумом.

Тепловые флуктуации напряжения на БЛМ, находящейся в симметричных растворах электролита, при отсутствии тока достаточно хорошо описываются соотношением (XXI.5.10) и (XXI.5.12).

Если ионные каналы проводимостью h_0 имеют только два состояния, соответствующие открытому и закрытому каналу, со средними временами состояний τ_0 и τ_3 соответственно, то для линейного участка вольт-амперной характеристики мембраны справедливо соотношение

$$e(f) = \frac{\tau_0^2 h_0 \bar{V}^2}{k_B T \tau_0} \frac{1}{1 + (2\pi f \tau)^2}, \quad (\text{XXI.5.14})$$

где \bar{V} — среднее падение напряжения на БЛМ, а $\tau = \tau_0 \tau_3 (\tau_0 + \tau_3)^{-1}$.

При условии, что среднее время закрытого состояния канала намного больше характерного времени открытого состояния $\tau_3 \gg \tau_0$, формула (XXI.5.14) упрощается:

$$e(f) = \frac{\tau_0 h_0 \bar{V}^2}{k_B T} \frac{1}{1 + (2\pi f \tau_0)^2}. \quad (\text{XXI.5.15})$$

Именно эту формулу используют обычно для расчета параметров каналов, спектры шума которых можно описать лоренцевской кривой.

Шум $1/f$. Существует еще один важный источник электрического шума в биологических и искусственных мембранах — так называемый фликкер-шум, или $1/f$ -шум, со спектральной плотностью, обратно пропорциональной частоте в широком диапазоне частот. Этот шум часто рассматривают как шум открытых каналов и называют его транспортным шумом. Спектральная плотность $1/f$ -шума на любой данной частоте пропорциональна квадрату среднего значения тока.

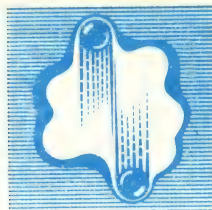
Дополнительный компонент транспортного шума ($1/f$) в регулируемых каналах осложняет спектр шумов, появляющихся в процессе открывания — закрывания каналов.

Дробовой шум. Этот шум в мембранах аналогичен по природе дробовому эффекту, наблюдаемому в электронных лампах и обусловленному дискретной природой носителей заряда. Флуктуации тока, соответствующие этому эффекту, должны иметь спектральную плотность

$$S_f(f) = 2qI, \quad (\text{XXI.5.16})$$

где q — заряд частиц, переносящих ток, а I — среднее значение тока. Предполагают, что интенсивность этого, не зависящего от частоты шума в мембранах настолько мала, что не может быть измерена.

Активный транспорт



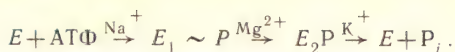
§ 1. Натрий-калиевый насос

Существование градиентов концентрации Na, K и Ca между внутри- и внеклеточной средой — основное условие поддержания потенциала покоя [см. (XIX.2.10)] и электрической возбудимости нервных и мышечных клеток. Ионы, способные проникать через мембрану, могут накапливаться в клетке или вытесняться из нее в соответствии с градиентом мембранного электрохимического потенциала. Так, несмотря на существование значительного градиента концентрации K^+ между клетками и средой, эти ионы находятся почти в равновесии. Градиент концентрации и градиент потенциала направлены в противоположные стороны.

Распределение Na^+ значительно отличается от равновесного: оба компонента пассивного потока — по градиенту концентрации и в направлении электрического поля — направлены внутрь клетки. Для поддержания низкого неравновесного уровня концентрации Na^+ в клетке необходим механизм активного выведения в среду. Такого рода системы активного транспорта обеспечивают перенос ионов против градиента электрохимического потенциала за счет энергии АТФ (Na^+ -насос плазматических мембран, Ca^{2+} -насос мембран саркоплазматического ретикулума; см. гл. XXV) или энергии окислительно-восстановительных реакций (H^+ -насос митохондрий, хлоропластов и других энергосопрягающих мембран; см. гл. XXIV). Не вызывает сомнений, что активный транспорт Na^+ в нервных клетках осуществляется Na^+, K^+ -АТФазой, локализованной в плазматических мембранах.

Первые успехи в исследовании Na^+, K^+ -АТФазы принадлежат Дж. С. Скоу (1957). Он изучал расщепление АТФ в препаратах мембран из нервов краба и показал, что гидролиз значительной части АТФ зависит от совместного действия ионов Na и K. Стимулируемая ионами Na^+ и K^+ -АТФазная активность подавляется уабаином. Повышение концентрации уабаина оказывало одинаковое подавляющее действие как на транспорт Na^+ , так и на активность АТФазы. Результаты количественных измерений показали, что при гидролизе одной молекулы АТФ происходит транспорт двух ионов K внутрь клетки и выведение трех (иногда двух) ионов Na из клетки. Таким образом, сложилось представление, что Na^+ -насос представляет собой локализованную в плазматической мембране клетки ферментную систему, осуществляющую перенос Na^+ из клетки во внеклеточную среду, а K^+ — в обратном направлении. Насос транспортирует ионы Na против градиентов электрохимических потенциалов за счет сопряжения ионообменных процессов с гидролитическим расщеплением АТФ Mg^{2+} -зависимой Na^+, K^+ -стимулируемой АТФазой.

Схема работы насоса разрабатывалась разными исследователями. Она предполагает последовательное протекание нескольких реакций в средах разного ионного состава в присутствии Mg^{2+} и АТФ:



На внутренней стороне мембраны в присутствии Na^+ и Mg-ATP происходит фосфорилирование белка. В роли акцептора фосфата выступает один из остатков глутаминовой кислоты. В ходе реакции освобождается АДФ. В результате фосфорилирования конформация белка изменяется таким образом, что обеспечивается переход Na^+ на внешнюю поверхность мембраны.

Следующая стадия состоит в дефосфорилировании белка. При этом изменяется сродство фермента к ионам K и Na , так что связывается K^+ . Белок возвращается к исходному конформационному состоянию. Конформационные изменения АТФазы сопровождаются переносом K^+ и Na^+ в разных направлениях.

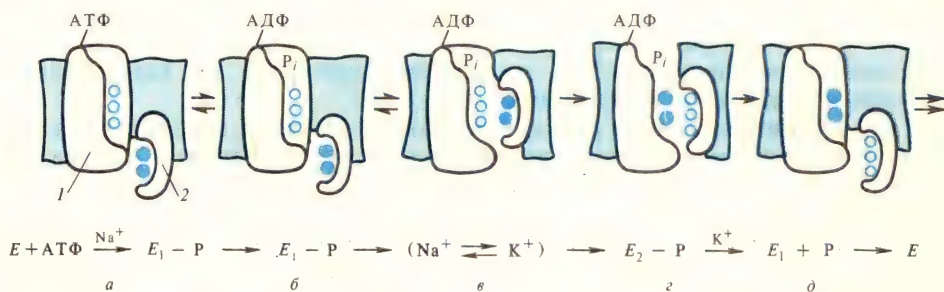


Рис. XXII.1. Рабочий цикл димера Na^+ -насоса в режиме Na^+/K^+ -обмена:

а—связывание Na^+ и K^+ в полостях субъединиц, б— Na -зависимое фосфорилирование большой субъединицы, в, г—обмен катионами между субъединицами, д— K^+ -зависимое дефосфорилирование и выброс ионов;

1—большая субъединица, 2—малая субъединица; полыми кружками изображены Na^+ , зачерненными— K^+ ; P_i —фосфат, E —фермент

Рассмотрим возможную природу конформационных перестроек фермента. Na^+ , K^+ -АТФаза состоит из двух полипептидных цепей с молекулярной массой 84 000 и 5700, которые формируют большую и малую субъединицы фермента. Белок прочно связан с фосфолипидами, полное удаление которых из мембран приводит к исчезновению АТФазной активности.

Вполне вероятно, что Na^+ и K^+ связываются одновременно с разными субъединицами, между которыми возможен обмен катионами. Таким образом исключается энергетически невыгодный поворот субъединиц фермента в мембране, при котором полярные группы белка должны погрузиться в гидрофобную зону бислоя, неполярные — войти в контакт с водой, а липидный бислой должен значительно перестроиться.

Предполагают, что Na^+ -связывающие центры локализованы в большой субъединице фермента. Ионообменная полость открывается с внутренней поверхности мембраны, а внешний вход в эту полость (канал) закрыт гидрофобным контактом липидов и белков (рис. XXII.1).

На рис. XXII.1 изображена последовательность превращений функционального димера Na^+ , K^+ -АТФазы. Гидролитический центр расположен на большой субъединице с внутренней стороны мембраны. Большой α -полипептид пронизывает мембрану, а гликопротеин (малая β -субъединица) расположен на ее наружной стороне. В исходном состоянии ионообменные полости субъединиц могут заполняться катионами только из примембранных слоев. Эти

полости из-за стерических затруднений могут вмещать три иона Na и лишь два иона K.

Конформационное состояние фермента определяет специфичность связывания ионов большой субъединицей. Для образования стабильного фосфорилированного интермедиата необходимо, чтобы с большой субъединицей были связаны три иона Na. Присоединение АТФ индуцирует конформационные изменения, в результате которых сродство большой субъединицы к Na^+ значительно возрастает. Одновременно увеличивается и эффективный отрицательный заряд ионообменной полости за счет близко расположенной отрицательно заряженной фосфатной группы АТФ.

Таким образом, в результате ионного обмена с внутриклеточной средой оказываются связанными три иона Na (рис. XXII.1, а), а затем происходит фосфорилирование большой субъединицы (рис. XXII.1, б). В результате последующих конформационных перестроек три иона Na оказываются замкнутыми в ионообменной полости большой субъединицы. На этой стадии сродство большой субъединицы к Na^+ понижается, а к K^+ повышается. Состояние $E \sim P$ энергетически невыгодно, и фермент переходит из «напряженного» состояния в стабильное состояние $E-P$.

Дальнейшее протекание реакции связано с участием малой субъединицы. В рамках описываемой модели предполагают, что субъединицы димера могут незначительно смещаться друг относительно друга в результате тепловых флуктуаций. Когда полость малой субъединицы совмещается с полостью большой субъединицы, между ними может происходить обмен катионами. За время жизни стабильного фосфорилированного состояния возможность для обмена ионами между субъединицами реализуется неоднократно. Если в каком-либо из этих случаев в полости малой субъединицы оказывается два иона K, то возникает состояние, изображенное на рис. XXII.1, в. В этом состоянии обмен ионами между полостями энергетически выгоден.

Замена трех ионов Na на два иона K в большой субъединице (стадия в—г) вновь приводит к возникновению конформационно неравновесного состояния системы. Уменьшение числа положительных зарядов в полости большой субъединицы сопровождается исчезновением большого активационного барьера, препятствующего дефосфорилированию фермента и отщеплению отрицательно заряженной фосфатной группы. При этом происходит открывание полости большой субъединицы во внутриклеточную среду. После диссоциации АДФ и P_i фермент возвращается в исходное состояние.

Изменение сродства ион-связывающих центров обусловлено изменением их геометрии при связывании АТФ, а также при фосфорилировании и дефосфорилировании фермента. Катионы, находясь в ион-связывающих полостях, образуют координационные связи с кислородсодержащими группами полипептидных цепей. При перестройке анионного окружения катионов происходит замещение ионов одного вида на другие катионы.

Согласно теоретическим расчетам, четыре атома O, расположенные в одной плоскости на определенных расстояниях, могут образовать Na^+ -специфичную ячейку, а шесть атомов O — K^+ -специфичную ячейку. Исходя из этого можно предполагать, что ион-связывающая полость большой субъединицы содержит 12 атомов O, которые попеременно могут образовывать координационную сферу для трех ионов Na или двух ионов K (рис. XXII.2). Переход между этими состояниями, соответствующими связыванию трех ионов Na или двух ионов K, т. е. перегруппировка лигандов, может являться основным энергозависимым процессом, обеспечивающим Na^+/K^+ -обмен в Na^+ -насосе (В. А. Твердислов).

При заполнении Na^+ -полости катионами из примембранных областей первый катион, попавший в полость, определяет тип симметрии лигандов и повышает вероятность попадания в полость катионов того же вида. Энергизованное состояние фермента возникает тогда, когда в результате фосфорилирования конфигурация лигандов перейдет в состояние, изображенное в правой

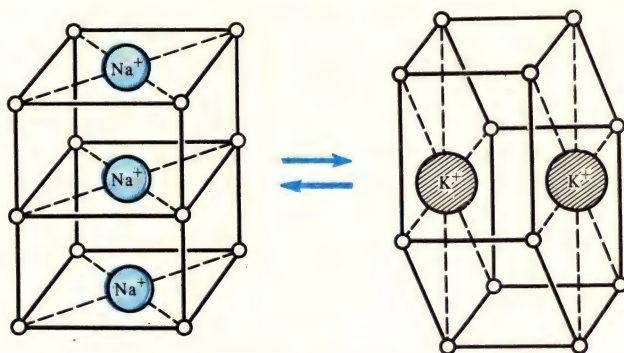


Рис. XXII.2. Две конформации Na^+ -полости Na^+ , K^+ -АТФазы

части рис. XXII.2, когда в полости еще осталось три иона Na . Это «напряженное» состояние фермента снимается при замене трех ионов Na на два иона K . Таким образом, энергия АТФ расходуется вероятнее всего на упорядоченное изменение сродства ион-связывающих центров к катионам, а само перемещение субъединиц осуществляется уже за счет тепловых колебаний.

§ 2. Активный транспорт кальция

Ca^{2+} -зависимая АТФаза, сопряженная с мощным Ca^{2+} -насосом, локализована в мембранах саркоплазматической сети и имеет некоторые сходные черты с Na^+ , K^+ -АТФазой. Ca^{2+} -АТФаза состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой около 100 000 и относительно высоким содержанием гидрофобных аминокислот (аминокислоты с неполярными боковыми цепями). Для работы Ca^{2+} -зависимой АТФазы также необходимо присутствие фосфолипидов.

Работу Ca^{2+} -АТФазы изучают на фрагментах саркоплазматического ретикулула, выделяемых из мышечной ткани, а также на мембранных пузырьках, которые образуются в определенных условиях в смеси очищенного препарата Ca^{2+} -АТФазы с фосфолипидами (реконструированная система — протеолипосомы; см. § 2 гл. XV).

Схема работы Ca^{2+} -АТФазы может быть представлена следующим образом. На первом этапе происходит связывание Ca^{2+} и АТФ. Эти соединения связываются с разными центрами на внешней поверхности мембранного пузырька. Константа связывания Ca^{2+} составляет порядка 10^7 M^{-1} . На втором этапе АТФ гидролизуетс с образованием фосфорилированного фермента. Образование фермент-фосфатного комплекса можно обнаружить по включению в белок радиоактивного изотопа ^{32}P из АТФ, меченной по фосфату. Образующаяся фосфорилированная форма фермента $E \sim \text{P}$ конформационно неустойчива и претерпевает изменение пространственной структуры так, что ион-связывающие участки оказываются отделенными от внешней среды. Изменение

конформации Ca^{2+} -АТФазы проявляется в изменении сигнала ЭПР спиновой метки, присоединенной к белку, в связи с изменением подвижности метки.

На следующем этапе цикла происходит изменение сродства Ca^{2+} -связывающих центров к ионам Са одновременно с изменением характера связи фосфатной группы с ферментом. Энергия, ранее сосредоточенная в макроэргической фосфатной связи комплекса $E \sim P$, расходуется на изменение константы связывания ионов Са с ферментом. Как и в случае Na^+ , K^+ -АТФазы, изменение сродства обусловлено, по-видимому, изменением расположения полярных групп, образующих координационные связи с Ca^{2+} . Вследствие происшедшего изменения пространственной структуры фермента ионы Са получают доступ во внутреннее пространство мембранных пузырьков и выбираются во внутренний объем. Константа связывания Ca^{2+} при образовании стабильной фосфорилированной формы фермента уменьшается от 10^7 до 10^3 M^{-1} .

На основании соотношения (V.1.12), связывающего константу химического равновесия с изменением свободной энергии в ходе реакции (ΔG_0), т. е. $\Delta G_0 = -RT \ln K$, можно найти, что изменение свободной энергии при уменьшении константы связывания от 10^7 до 10^3 M^{-1} составляет 17,8 кДж/моль. Таким образом, суммарные затраты энергии на перенос Ca^{2+} через мембрану примерно вдвое меньше энергии гидролиза АТФ (около 40 кДж/моль при рН 9), которой хватает на перенос двух ионов Са. Вследствие десорбции Ca^{2+} с фермента суммарный положительный заряд в ион-связывающей полости уменьшается, что значительно облегчает десорбцию фосфата. В результате этих превращений фермент вновь приходит в исходное состояние.

§ 3. Электрогенный транспорт ионов

Активный транспорт ионов может быть электронейтральным или электрогенным. Транспортная система электронейтральна в том случае, если ее функционирование сопровождается обменом внутриклеточных ионов на внеклеточные в соотношении «заряд на заряд». В такой ситуации система активного транспорта является лишь средством поддержания концентрационных градиентов и не участвует непосредственно в создании разности потенциалов на клеточной мембране. Потенциал на мембране создается тогда только за счет диффузии ионов по градиентам концентрации.

В том случае, если количество зарядов, переносимых в одном направлении в единицу времени, не компенсируется суммой зарядов, переносимых в противоположном направлении, транспортный механизм непосредственно участвует в создании дополнительной разности потенциалов на мембране. Например, в электрогенном режиме работает Na^+ -насос, обменивая три иона Na на два иона K.

Системы электрогенного активного транспорта были впервые выявлены и наиболее подробно изучены на коже лягушки, а впоследствии и на других эпителиальных тканях. Если разделить две камеры, содержащие раствор Рингера, участком кожи лягушки, то между наружной и внутренней поверхностями кожи возникает разность потенциалов, достигающая 100 мВ (внутренняя поверхность кожи положительна по отношению к внешней). Подавая от внешнего источника э. д. с. противоположного направления (рис. XXII.3), можно скомпенсировать разность потенциалов на коже до нуля (так называемый режим короткого замыкания кожи). В этих условиях пассивный перенос ионов должен прекратиться (так как нет ни градиентов концентрации, ни разности потенциалов) и односторонние потоки пассивно транспортируемых

ионов — выравниваться. Однако в действительности поток меченого Na^+ , направленный от наружной поверхности кожи к внутренней, намного превышает поток Na^+ в противоположном направлении. Суммарный поток Na^+ через кожу лягушки пропорционален значению электрического тока. Таким образом, значение тока короткого замыкания пропорционально скорости активного транспорта Na^+ , направленного от наружной к внутренней поверхности кожи.

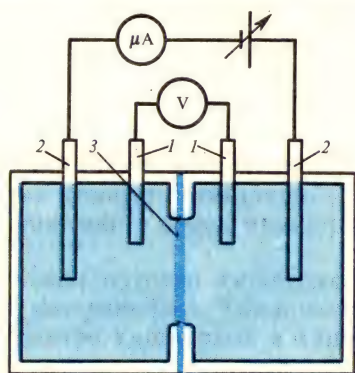


Рис. XXII.3. Принципиальная схема измерения тока короткого замыкания на коже лягушки:

1 — измерительные электроды, 2 — токовые электроды, 3 — кожа лягушки

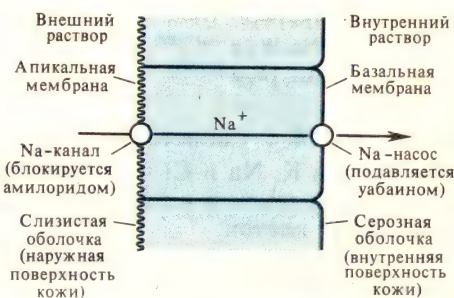


Рис. XXII.4. Активный транспорт натрия в эпителиальных тканях

Процесс активного транспорта Na^+ в коже лягушки со стороны слизистой оболочки (наружная поверхность кожи) в сторону серозной оболочки (внутренняя поверхность кожи) близок по механизму к переносу ионов через эпителий в кишечнике и почечных канальцах. Общая схема переноса Na^+ через слой клеток эпителия представлена на рис. XXII.4.

Во многих эпителиальных тканях обнаружена система активного электрогенного транспорта Cl^- . Вклад этих систем в ток короткого замыкания обычно намного меньше тока активного транспорта Na^+ .

У растительных клеток вклад электрогенных транспортных систем в мембранный потенциал в целом значительно выше, чем в клетках животных. Это проявляется в том, что значение мембранного потенциала клетки намного превышает максимально возможный уровень потенциала, создаваемого за счет пассивной диффузии ионов, в частности уровень равновесного калиевого потенциала. Так, мембранный потенциал в гифах грибов *Neurospora* составляет -200 мВ, а значение нернстовского потенциала для K^+ равно -133 мВ. В клетках листа элодеи, ряски, харовых водорослей мембранный потенциал достигает значений 250 — 270 мВ (цитоплазма отрицательна), что превышает уровень равновесного K^+ -потенциала на 100 — 120 мВ. Добавление в среду ингибиторов дыхания приводит к деполяризации клеток до уровня равновесного K^+ -потенциала. Предполагают, что высокий уровень мембранного потенциала в клетках растений поддерживается АТФ-зависимой системой активного электрогенного транспорта H^+ из цитоплазмы в наружную среду. В качестве альтернативной гипотезы существует предположение о наличии в плазмалемме растительных клеток цепи переноса электронов, функционирование которой сопряжено с поглощением H^+ из цитоплазмы и выделением H^+ в наружную среду (редокс-помпа, см. § 3 гл. XXIV).

Выражение для мембранного потенциала можно получить, используя аппарат кинетики химических реакций. Так, если в клеточной мембране существует система активного транспорта Na^+ наружу, а пассивно переносятся ионы K , Na и Cl , то стационарные потоки K^+ , Na^+ и Cl^- , направленные внутрь клетки и в наружную среду, с учетом влияния мембранного потенциала φ можно записать в таком виде:

<i>Входящий поток</i>	<i>Выходящий поток</i>
$[\text{K}_o] k_K e^{\varphi F / (RT)}$	$[\text{K}_i] k_K$
$[\text{Na}_o] k_{\text{Na}} e^{-\varphi F / (RT)}$	$[\text{Na}_i] k_{\text{Na}} + [\text{Na}_i] k_a$
$[\text{Cl}_o] k_{\text{Cl}} e^{\varphi F / (RT)}$	$[\text{Cl}] k_{\text{Cl}}$

Здесь k_K , k_{Na} , k_{Cl} — константы скорости, характеризующие пассивное проникновение ионов K , Na и Cl через мембрану; k_a — константа скорости активного транспорта; индексы o и i относятся к концентрациям ионов в наружной среде и цитоплазме клеток.

В стационарном состоянии сумма всех входящих потоков равна сумме выходящих потоков (потоки Cl^- в противоположных направлениях обычно равны друг другу). Условие равенства входящих и выходящих потоков имеет вид

$$[\text{K}_o] k_K e^{-\varphi F / (RT)} + [\text{Na}_o] k_{\text{Na}} e^{-\varphi F / (RT)} = [\text{K}_i] k_K + [\text{Na}_i] k_{\text{Na}} + [\text{Na}_i] k_a. \quad (\text{XXII.3.1})$$

Решая уравнение (XXII.3.1) относительно потенциала, получим

$$\varphi = -\frac{RT}{F} \ln \frac{k_a [\text{Na}_i] + k_K [\text{K}_i] + k_{\text{Na}} [\text{Na}_i]}{k_K [\text{K}_o] + k_{\text{Na}} [\text{Na}_o]}. \quad (\text{XXII.3.2})$$

Первый член в числителе логарифмического выражения отражает активность электрогенного ионного насоса. Если активный транспорт неэлектрогенен, то этот член отсутствует и выражение (XXII.3.2) становится идентичным уравнению Гольдмана [см. (XX.1.2)] для мембранного потенциала, обусловленного пассивными ионными потоками.

Другой подход к описанию мембранного потенциала, создаваемого за счет пассивной диффузии и электрогенного транспорта ионов, основан на анализе эквивалентной электрической схемы мембраны. Простейшим электрическим аналогом является схема, состоящая из двух параллельно соединенных цепей (рис. XXII.5).

Это так называемая модель электрогенного насоса с утечкой. Левая ветвь цепи соответствует путям пассивной диффузии, причем g_n — суммарная проводимость мембраны по диффузионным каналам, а электродвижущая сила E_n представляет собой диффузионный потенциал, рассчитываемый по (XX.1.2). Правая ветвь цепи соответствует электрогенному насосу, проводимость которого равна g_a , а э. д. с. — E_a .

Если э. д. с. насоса отличается от диффузионной э. д. с., то в рассматриваемой цепи течет круговой ток (i), который создает дополнительное падение напряжения на сопротивлении $1/g_n$. Таким образом, суммарную разность потенциалов на мембране можно записать в виде

$$\varphi = E_n + i/g_n. \quad (\text{XXII.3.3})$$

Уравнение (XXII.3.3) показывает, что мембранный потенциал в этом случае можно рассматривать как сумму диффузионной составляющей и электро-

генной компоненты. Силу тока в цепи (i) можно выразить по закону Ома:

$$i = (E_a - E_n) / (1/g_a + 1/g_n). \quad (\text{XXII.3.4})$$

После преобразований и подстановки (XXII.3.4) в (XXII.3.3) получаем формулу, описывающую мембранный потенциал в рамках рассматриваемой эквивалентной схемы:

$$\varphi = \frac{g_n}{g_n + g_a} E_n + \frac{g_a}{g_n + g_a} E_a. \quad (\text{XXII.3.5})$$

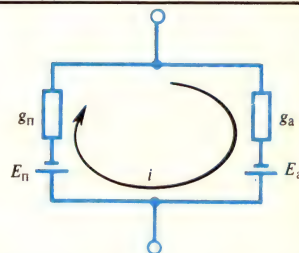


Рис. XXII.5. Упрощенная эквивалентная электрическая схема мембраны, содержащей параллельно функционирующие электрогенный насос и каналы пассивной диффузии ионов:

g_n и g_a — проводимости каналов пассивной диффузии и системы активного транспорта, E_n и E_a — соответствующие им э. д. с.

Вопрос о том, какой вклад вносит проводимость насоса (g_a) в суммарную проводимость мембраны, в настоящее время окончательно не выяснен. Это в первую очередь относится к мембранам растительных клеток. Электрогенный насос обычно уподобляют генератору тока, т. е. считают, что его внутреннее сопротивление намного больше сопротивления мембран для пассивного потока ионов ($g_a \ll g_n$), а иногда — источнику э. д. с. ($g_a \gg g_n$).

Выражение для э. д. с. насоса можно получить, рассматривая условие термодинамического равновесия для сопряженных реакций гидролиза АТФ и активного переноса ионов через мембрану. В случае H^+ -насоса получим

$$E_a = \frac{\Delta\mu}{\nu F} - \frac{RT}{F} \ln \frac{[H_i]}{[H_o]}, \quad (\text{XXII.3.6})$$

где $\Delta\mu$ — изменение свободной энергии в ходе химической реакции (гидролиз АТФ); ν — стехиометрический коэффициент, отражающий количество транспортируемых протонов при гидролизе одной молекулы АТФ; $[H_i]$ и $[H_o]$ — концентрации протонов в цитоплазме и внешней среде. Уравнение (XXII.3.6) предсказывает зависимость э. д. с. насоса как от рН среды, так и от рН цитоплазмы.

Функциональная роль электрогенного H^+ -насоса растительной клетки состоит в регуляции рН цитоплазмы. Кроме того, градиент рН, создаваемый на мембране, способствует процессам накопления сахаров и аминокислот при сопряжении этих процессов с пассивным потоком H^+ .

§ 4. Транспорт протонов

В функционировании биоэнергетических систем важное место принадлежит транспорту протонов. Перенос электронов в энергосопрягающих мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий сопровождается трансмембранным переносом H^+ и образованием градиента электрохимического потенциала этого иона $\Delta\mu_{H^+}$, который включает электрический (мембранный потенциал) и концентрационный (градиент рН) компоненты:

$$\Delta\mu_{H^+} = RT \ln (c_i/c_o) + zF (\varphi_i - \varphi_o) = zF \Delta\varphi - 2,3 RT \Delta pH. \quad (\text{XXII.4.1})$$

В приведенном выражении индексы i и o относятся к растворам, находящимся внутри и снаружи замкнутой мембранной системы. В сопрягающих мембранах локализованы также АТФ-синтазные системы, через каналы которых осуществляется пассивное движение H^+ по градиенту электрохимического потенциала (подробнее см. гл. XXIV). В последнее время возрастает интерес к латеральному транспорту H^+ по поверхности мембран, а также по микроструктурам цитозоля.

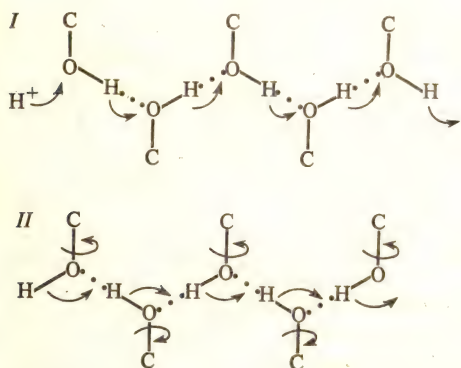


Рис. XXII.6. Проведение протона по цепи Н-связей:

I—стадия перескока протона, II—стадия поворота групп (миграция поворотного дефекта)

Перенос H^+ через мембраны может осуществляться механизмами трех типов. В некоторых мембранах существуют подвижные переносчики протонов (пластохинон в фотосинтетической мембране хлоропластов). Возможны также конформационные переходы мембранного белка при связывании протона на одной стороне мембраны и депротонировании белка с другой стороны мембраны, сопряженные с поворотом макромолекулы в мембране, при котором присоединенный протон пересекает мембрану. Наконец, протоны могут транспортироваться через мембрану по специализированным структурам — H^+ -каналам. Протонный канал представляет собой узкую полость, образованную полярными группами белка.

Протонный канал — важный компонент всех H^+ -АТФаз. Он образован гидрофобной частью субъединицы сопрягающего фактора — комплексом CF_0 . По H^+ -каналу протоны поступают к каталитическому участку транспортной системы, в котором осуществляется сопряжение переноса H^+ с реакциями синтеза — гидролиза АТФ. Таким образом, основными узлами H^+ -насосов являются протонный канал и активный центр.

Транспорт протонов по H^+ -каналам обычно сравнивают с переносом H^+ по регулярной решетке, образованной системой водородных связей, аналогичной таковой во льду. В структуре льда возможны переходы протона от одной молекулы воды к соседней (см. § 4 гл. IX). В результате возникает ионная пара, состоящая из положительно заряженного иона гидроксония H_3O^+ и гидроксила OH^- . В отсутствие электрического поля обмен протонами происходит хаотично, однако при создании разности потенциалов возникает направленная миграция дефектов. В итоге достигается быстрое смещение протонов вдоль упорядоченной цепи водородных связей.

В некоторых кристаллах (например, имидазол), которые содержат систему водородных связей, ориентированных в определенном направлении, подвижность протона в направлении цепи Н-связей в 10^3 раз выше, чем в перпендикулярном направлении. В биологических мембранах системы водород-

ных связей, по которым транспортируются протоны, образованы полярными группами, не участвующими в формировании Н-связей α -спирали полипептидной цепи. Для формирования сквозной трансмембранной структуры, транспортирующей H^+ , необходимо около 20 аминокислотных остатков.

Эстафетная передача протонов возможна лишь при чередовании стадий перескока протона и поворотов химических связей в области образовавшегося дефекта (рис. XXII.6). Как видно из рисунка, транслокация одного протона по цепи протекает в две стадии. Сначала происходит перескок протона от группы к группе (рис. XXII.6, I), а затем поворот группы (на рис. XX.6, II поворот вокруг связи C—O), в результате которого происходит дополнительное смещение заряда, и система связей возвращается в исходное состояние. В результате поворота химической группы или молекул воды образуется конфигурация, не допускающая возврат протона в начальное положение. В жесткой структуре α -спирали повороты групп крайне затруднены; поэтому система Н-связей α -спирали не способна проводить протоны.

На стадии миграции ионного дефекта лишь некоторая часть от полного заряда протона смещается за счет перескока H^+ от группы к группе. Остальная часть заряда смещается за счет поворота полярной группы. Во льду, например, доля ионного дефекта в переносе заряда составляет 0,62 от полного заряда протона. Благодаря разделению заряда протона при переносе между ионным и поворотным дефектами существенно снижается энергетический барьер переноса H^+ через мембрану. Высота барьера определяется уровнем электростатической энергии заряда в ионном канале и оценивается по формуле Борна [см. (XXI.1.1)]. Как следует из этой формулы, уменьшение транспортируемого заряда в два раза по сравнению с зарядом протона приводит к 4-кратному уменьшению энергии активации переноса H^+ через мембрану. Характерные подвижности ионного и поворотного дефектов составляют 10^{-3} и 10^{-4} см²/(В·с) соответственно. Согласно расчетам, время миграции ионного и поворотного дефекта через мембрану толщиной 5 нм не превышает 0,25 мкс и 2,5 мкс соответственно.

Цепь Н-связей может не только обеспечивать подведение H^+ к активному центру АТФазы, но и составлять часть активного центра. Согласно одной из гипотез, перенос ионного дефекта по цепи Н-связей вызывает конформационное изменение белка, а последующее распространение поворотного дефекта приводит к восстановлению исходной конформации. Такая «молекулярная машина» может быть использована для выполнения механической работы и синтеза АТФ. Однако детальные молекулярные модели сопряжения конформационных изменений белка с выполнением биоэнергетических функций еще не разработаны (см. § 4 гл. XXIV).

В общем виде систему активного транспорта рассматривают как трансмембранный канал с большим числом участков связывания H^+ , в котором транслокация протонов происходит за счет последовательных перескоков H^+ между участками связывания. Такой ионный канал может работать как ионный насос, если структура энергетических барьеров претерпевает динамические изменения за счет энергообеспечивающей реакции, например изменяются константа диссоциации протон-связывающих участков канала и высота соседних барьеров. В этом случае протон будет освобождаться преимущественно с одной стороны мембраны, а поглощаться — с другой.

На рис. XXII.7 показаны профили потенциальной энергии H^+ для основного и энергизованного состояния канала, формируемого бактериородопсином в мембранах галофильных бактерий (см. гл. XXIX). В основном состоянии протон занимает наиболее глубокую потенциальную яму, соответствующую главному участку связывания. Этот участок доступен с цитоплазматической

стороны мембраны, но отделен от внешней среды высоким энергетическим барьером. При поглощении бактериородопсином кванта света энергетический уровень участка связывания и высота барьеров изменяются таким образом, что протон высвобождается во внешний раствор. Изменение высоты активационных барьеров может быть обусловлено даже небольшими изменениями конформации H^+ -канала. Полный цикл, соответствующий активному транспорту одного H^+ бактериородопсином, можно представить в виде схемы (рис. XXII.8).

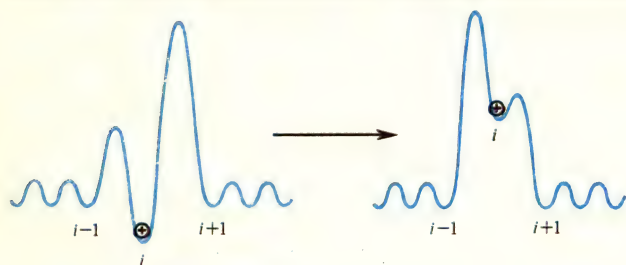


Рис. XXII.7. Энергозависимые изменения структуры барьеров в ионном канале активной транспортной системы:
 i — потенциальный минимум

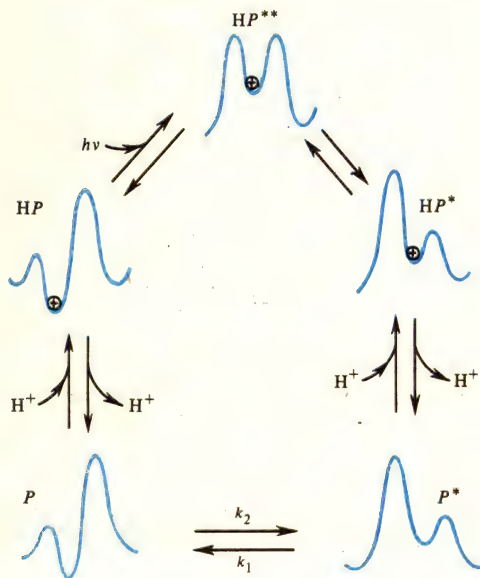


Рис. XXII.8. Изменение высоты активационных барьеров и трансмембранный перенос протона (H) в цикле бактериородопсина (P)

Поглощение кванта света переводит канал из основного состояния HP в активированное состояние HP^* через короткоживущее возбужденное состояние HP^{**} . После высвобождения протона с противоположной стороны мембраны происходит переход канала к исходной конформации P и поступление протона в канал

Рассмотренная схема может быть распространена на H^+ -насосы, использующие в качестве источника энергии разность окислительно-восстановительных потенциалов. В этом случае разные конформационные состояния канала соответствуют окисленной и восстановленной форме ферментов — переносчиков электрона. Аналогичным образом можно описать АТФ-зависимый транспорт протонов.

Модификации профиля потенциальной энергии иона в канале могут возникать не только за счет небольших изменений конформации канала, но и вследствие изменения дипольного момента функциональных групп, расположенных вблизи ион-транспортного пути.

Глава XXIII

Транспорт ионов в возбудимых мембранах



§ 1. Потенциал действия

Нервные импульсы, возникающие в отдельных волокнах, имеют постоянную амплитуду и форму. Одиночный нервный импульс — потенциал действия — длится примерно 1 мс и распространяется со скоростью от 1 до 100 м/с.

В основе современных представлений о процессе генерации нервного импульса лежат исследования, выполненные на гигантских нервных волокнах кальмара А. Ходжкиным, А. Хаксли и Б. Катцем. Для измерения потенциала действия внутрь аксона вводят тонкий стеклянный капилляр с диаметром кончика менее 0,5 мкм, заполненный концентрированным раствором KCl, что не оказывает заметного влияния на активность аксона.

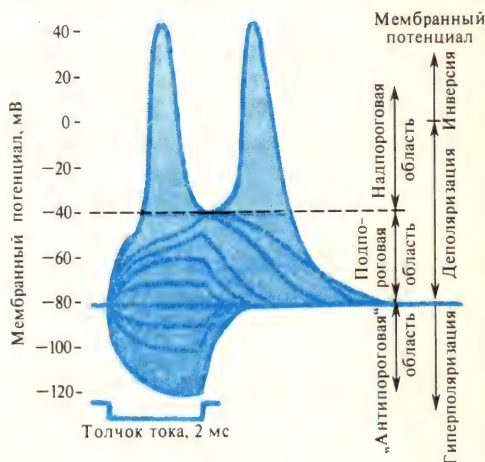


Рис. XXIII.1. Возникновение импульса в результате местной деполаризации (по Б. Катцу, 1968)

При действии толчка тока фиксированной длительности (2 мс), но различной силы и направления возникают изменения мембранного потенциала, представленные семейством кривых на графике

При пропускании гиперполяризующих или подпороговых деполаризующих импульсов тока мембрана ведет себя подобно пассивной RC -цепи, заряжаясь экспоненциально от исходного до нового уровня с характерным временем τ , равным произведению сопротивления на емкость мембраны (рис. XXIII.1). При действии надпороговых деполаризующих импульсов наблюдается быстрое смещение значений потенциала внутренней части волокна до уровня $+ (40-50)$ мВ и последующий их возврат с кратковременной стадией следовой гиперполяризации. Амплитуда потенциала действия составляет 100—120 мВ.

Потенциал покоя. Как и протоплазма многих других клеток, аксоплазма содержит в высокой концентрации K^+ и в относительно низкой концентрации

Na^+ и Cl^- . Ионы K внутри волокна свободны и не связаны с белками или другими крупными молекулами.

В состоянии покоя мембрана более проницаема для K^+ , чем для Na^+ . Вследствие диффузии K^+ наружу из аксоплазмы внутреннее содержимое нервного волокна в состоянии покоя заряжено отрицательно по отношению к наружному раствору. Эта постоянная разность потенциалов — потенциал покоя — равна 50—70 мВ. Какими факторами определяется это значение? Если бы мембрана была проницаема только для K^+ , равновесная разность потенциалов достигла бы значения, определяемого уравнением Нернста [см. (XVIII.3.1)] для калиевого электрода

$$\varphi_{\text{K}} = (RT/F) \ln ([\text{K}_o]/[\text{K}_i]), \quad (\text{XXIII.1.1})$$

где φ_{K} — равновесный потенциал для K^+ . При концентрациях K^+ в крови (20 мМ) и аксоплазме (400 мМ) кальмара рассчитанное значение φ_{K} равно —75 мВ. Действительно, в интактных аксонах регистрируют потенциалы покоя около —70 мВ. Следовательно, в этих условиях мембрана ведет себя подобно K^+ -электроду. Однако при более низких концентрациях K^+ в среде потенциал покоя уже существенно отличается от расчетных значений равновесного потенциала φ_{K} .

Как оказалось, зависимость потенциала покоя от концентрации K^+ в среде значительно лучше описывается уравнением Гольдмана (см. (XIX.2.10)], которое выведено в рамках электродиффузионной теории в приближении постоянного поля.

В состоянии покоя распределение Cl^- близко к равновесному, т. е. потоки Cl^- из клетки и внутрь ее одинаковы. В этом случае условие нулевого тока через мембрану [см. (XIX.2.8)] $I_{\text{K}} + I_{\text{Na}} + I_{\text{Cl}} = 0$ упрощается до $I_{\text{K}} + I_{\text{Na}} = 0$ и потенциал покоя вычисляется по формуле

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{K}}([\text{K}_o] + P_{\text{Na}}[\text{Na}_o])}{P_{\text{K}}[\text{K}_i] + P_{\text{Na}}[\text{Na}_i]}. \quad (\text{XXIII.1.2})$$

Потенциал на мембране в состоянии покоя (XXIII.1.2) приближается к равновесному потенциалу для K^+ , так как коэффициент проницаемости для K^+ в этих условиях намного больше коэффициента проницаемости для Na^+ ($P_{\text{K}}:P_{\text{Na}} = 1:0,04$).

Генерация импульса. Реверсия мембранного потенциала во время развития импульса вызвана тем, что на гребне спайка мембрана избирательно проницаема для Na^+ , так что отношение ионных проницаемостей становится равным $P_{\text{K}}:P_{\text{Na}} = 1:20$. Как видно из формулы (XXIII.1.2), в этих условиях ($P_{\text{Na}} \gg P_{\text{K}}$) потенциал на мембране приближается к равновесному натриевому потенциалу φ_{Na} . Разность потенциалов на мембране, проницаемой только для Na^+ , выражается формулой Нернста

$$\varphi_{\text{Na}} = (RT/F) \ln ([\text{Na}_o]/[\text{Na}_i]). \quad (\text{XXIII.1.3})$$

Предельное значение потенциала, вычисленное по (XXIII.1.3), равно +55 мВ, что лишь немного превышает экспериментально наблюдаемые значения обращенного потенциала. Эти выводы сохраняются, если воспользоваться для выражения мембранного потенциала более полной формулой [см. (XIX.3.5)], где учтены потоки Cl^- :

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{K}}[\text{K}_o] + P_{\text{Na}}[\text{Na}_o] + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}_i]}{P_{\text{K}}[\text{K}_i] + P_{\text{Na}}[\text{Na}_i] + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}_o]}. \quad (\text{XXIII.1.4})$$

В состоянии покоя $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45$, а в состоянии возбуждения на пике потенциала действия, когда вновь соблюдается условие нулевого тока через мембрану, $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 20 : 0,45$.

Для описания изменений мембранного потенциала при возбуждении помимо приближения постоянного поля [см. (XXIII.1.4)] часто используют и другой подход, основанный на представлении ионных проводимостей мембраны в виде эквивалентной электрической цепи (рис. XXIII.2).

Мембранный потенциал, измеряемый на схеме между точками i и o (внутренняя и наружная среда клетки), создается электродвижущими силами, равными равновесным потенциалам отдельных видов ионов, последовательно соединенными с соответствующими сопротивлениями. Ток в каждой из ветвей равен

$$I_i = g_i(\varphi - \varphi_i), \quad (\text{XXIII.1.5})$$

где g_i — проводимость мембраны для данного вида ионов, φ_i — равновесный потенциал данного вида ионов, а φ — общий потенциал на мембране. Используя условие, что в разомкнутой цепи при постоянном напряжении на мембране сумма токов равна нулю, можно получить следующее выражение для мембранного потенциала:

$$\varphi = g_K \varphi_K / g_m + g_{Na} \varphi_{Na} / g_m + g_{Cl} \varphi_{Cl} / g_m, \quad (\text{XXIII.1.6})$$

где g_m — суммарная проводимость мембраны: $g_m = g_K + g_{Na} + g_{Cl}$

Из (XXIII.1.6) видно, что значение мембранного потенциала определяется теми ионами, для которых проводимость мембраны максимальна. Уравнение (XXIII.1.6) во многих случаях лучше описывает зависимости мембранного потенциала от концентрации ионов в среде, чем уравнение (XXIII.1.4).

Эквивалентная схема ионных проводимостей мембраны и основанное на ней уравнение (XXIII.1.6) предполагают, что разные виды ионов проникают через клеточную мембрану по пространственно разделенным путям. Это соответствует современным представлениям о существовании отдельных типов ионных каналов, селективно проницаемых для Na^+ и K^+ .

Процесс возбуждения развивается вследствие зависимости проницаемости мембраны для ионов от мембранного потенциала. При достижении критической деполяризации, когда возрастает проницаемость мембраны для Na^+ , эти ионы устремляются внутрь и вызывают дальнейшую деполяризацию мембраны. Процесс продолжается до тех пор, пока потенциал не сместится до равновесного натриевого потенциала. В этих условиях потоки Na^+ наружу и внутрь сравниваются. Затем происходит увеличение проницаемости для K^+ и ионы K^+ начинают выходить из клетки по градиенту своего электрохимического потенциала. В этом процессе мембрана реполяризуется. Выход K^+ прекращается, когда потенциал на мембране приблизится к равновесному калиевому потенциалу.

Важным подтверждением мембранной теории возбуждения явились эксперименты по регистрации потенциала действия на перфузируемых аксонах, у которых аксоплазма заменена на подходящий солевой раствор (например,

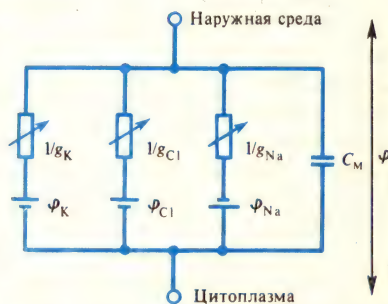


Рис. XXIII.2. Эквивалентная схема мембраны нервной или мышечной клетки (по Б. Катцу, 1968):

$\varphi_K, \varphi_{Cl}, \varphi_{Na}$ — равновесные потенциалы для K^+, Cl^-, Na^+ ; g_K, g_{Cl}, g_{Na} — проводимости для K^+, Cl^-, Na^+ ; C_m — емкость мембраны; φ — мембранный потенциал

K_2SO_4). Заполненные искусственным раствором аксоны проводят импульсы в течение нескольких часов, хотя в результате перфузии удаляется около 95% аксоплазмы. Опыты с перфузией аксона подтвердили идею о том, что потенциал покоя регулируется K^+ . Так, при перфузии аксона бескальциевым раствором потенциал покоя был близок к нулю. Повышение концентрации K^+ внутри аксона в интервале до 150 мМ сопровождалось повышением потенциала покоя в соответствии с уравнением Нернста.

Аналогичные опыты с изменением концентрации Na^+ в перфузируемом растворе выявили зависимость пикового значения потенциала действия от внутриклеточной концентрации Na^+ . При повышении концентрации Na^+ величина спайка уменьшалась, а при замене 50% калия на натрий в перфузируемом растворе проведение возбуждения прекращалось.

Одно из веских доказательств мембранной теории состоит в том, что проведение импульса связано с заметным возрастанием скорости движения Na^+ и K^+ по градиентам концентрации. Количество входящего Na^+ и выходящего K^+ можно определить с помощью изотопов или методом пламенной фотометрии после многократной стимуляции аксона. Результаты измерений показывают, что в гигантском аксоне каракатицы каждый импульс связан не только с входящим потоком Na^+ ($10,3 \text{ пмоль/см}^2$), но и с выходящим потоком этого же иона ($6,6 \text{ пмоль/см}^2$). Таким образом, суммарный вход Na^+ составляет $3,7 \text{ пмоль/см}^2$, что приблизительно соответствует потере K^+ на один импульс.

Количество входящего Na^+ вполне достаточно для переполаризации мембраны в период потенциала действия. Действительно, чтобы изменить напряжение конденсатора емкостью 1 мкФ на 120 мВ необходим заряд, равный $0,12 \cdot 10^{-6}$ Кл. Это эквивалентно $1,2 \cdot 10^{-12}$ моль одновалентного катиона, что составляет лишь $1/3$ от наблюдаемого входа Na^+ . Таким образом, общее количество входящего Na^+ значительно превышает минимум, необходимый для изменения потенциала на мембране при возбуждении. Превышение минимума объясняется тем, что Na^+ входит не только во время восходящей фазы спайка. Вход Na^+ продолжается и во время ранней фазы спада, когда высока проницаемость и для Na^+ , и для K^+ . В этот период заряд, переносимый входящим Na^+ , с избытком компенсируется выходящим K^+ .

После прохождения по аксону одного спайка система возвращается в исходное состояние, за исключением того, что в клетке появился некоторый избыток ионов Na, вошедших в период деполяризации, и некоторый недостаток ионов K, вышедших на фазе реполяризации. Изменения внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+ , вызванные одиночным потенциалом действия, крайне малы, но могли бы оказаться значительными при многократном прохождении нервных импульсов. Для поддержания постоянного уровня внутриклеточных концентраций K^+ и Na^+ в клеточной мембране и существует система Na^+ , K^+ -насоса (см. § 1 гл. XXII), обеспечивающая активное выведение Na^+ в обмен на поступление в клетку K^+ , работающая за счет энергии АТФ.

§ 2. Ионные токи в мембране аксона

Наиболее важные успехи в изучении механизмов возбудимости были достигнуты благодаря измерениям мембранного тока методом фиксации потенциала (К. Коул, 1949). В обычных измерениях потенциала действия проницаемости для Na^+ и K^+ являются функцией двух переменных: значения мембранного потенциала и времени. В методе фиксации потенциала смещения мембранного потенциала находятся под контролем, что дает возможность четко разграничить влияние этих двух факторов за счет подавления автоматического взрыво-подобного развития потенциала действия.

В методе фиксации потенциала используют электронную управляющую систему с обратной связью, которая обеспечивает поддержание мембранного потенциала на заданном уровне. При этом регистрируется ток, текущий через мембрану. На рис. XXIII.3 представлен способ измерения тока при фиксации потенциала.

При ступенчатом смещении командного потенциала от уровня потенциала покоя напряжение на мембране практически мгновенно устанавливается на

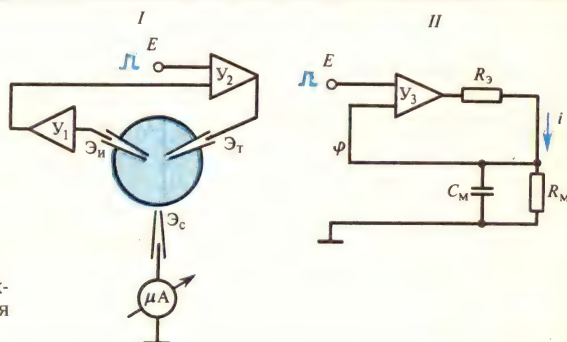


Рис. XXIII.3. Принципиальная (I) и эквивалентная (II) схемы установки для фиксации мембранного потенциала

Основу установки составляет дифференциальный усилитель (U_2) с высоким коэффициентом усиления, на один вход которого подается разность потенциалов между измерительным микроэлектродом (E_n) и наружным электродом сравнения (E_t), т. е. мембранный потенциал (измеряется усилителем U_1). На другой вход поступает командный потенциал E . Если командный потенциал E равен потенциалу покоя ϕ , то напряжение на выходе дифференциального усилителя равно нулю и в цепи, включающей токовый электрод, (E_t) клеточную мембрану и электрод сравнения, ток не течет. Если же командный потенциал отличается от потенциала покоя, то на выходе дифференциального усилителя возникает напряжение, пропорциональное разности потенциалов ($E - \phi$) с коэффициентом пропорциональности $K_0 \sim 10^6$ (K_0 — коэффициент усиления операционного усилителя). При этом в цепи обратной связи через токовый микроэлектрод с сопротивлением R_3 , клеточную мембрану и электрод сравнения потечет ток, который смещает потенциал на мембране, приближая его к заданному уровню потенциала E .

новом заданном уровне, равном командному сигналу. Ток, текущий при этом через мембрану, измеряется с помощью включенного в цепь усилителя тока, показанного на схеме в виде микроамперметра.

Данные, получаемые методом фиксации потенциала, интерпретируют обычно на основе эквивалентной схемы возбудимой мембраны (см. рис. XXIII.2). Каждый элемент мембраны нервного волокна содержит мембранную емкость C_m , калиевую батарею ϕ_k и сопротивление $1/g_k$, а также натриевую батарею ϕ_{Na} и сопротивление $1/g_{Na}$. Сопротивление утечки $\sim 1/g_l$ и батарея ϕ_l введены для учета движения ионов, проходящих по каналам, которые не меняются во время активности. Волокно в целом следует рассматривать в виде большого числа подобных элементов, связанных между собой и образующих непрерывный кабель.

В состоянии покоя ток через мембрану не течет. Если потенциал на мембране сместить от уровня потенциала покоя в сторону деполяризации, то проницаемости Na^+ - и K^+ -каналов изменяются определенным образом от одного стационарного состояния к другому. В этом случае в каждом из параллельно соединенных участков текут токи, пропорциональные разности между равновесным потенциалом иона ϕ_i и поддерживаемым на мембране потенциалом:

$$I_i = g_i(\phi - \phi_i), \quad (XXIII.2.1)$$

где g_i — проводимость мембраны для данного вида ионов. Общий ток через мембрану $I_{\text{общ}}$ равен сумме емкостного тока и ионного тока, обусловленного движением ионов по отдельным путям:

$$I_{\text{общ}} = C_m d\varphi/dt + I, \quad (\text{XXIII.2.2})$$

где C_m — мембранная емкость, $d\varphi/dt$ — скорость изменения мембранного потенциала, $I = \sum I_i$ — трансмембранный ионный ток.

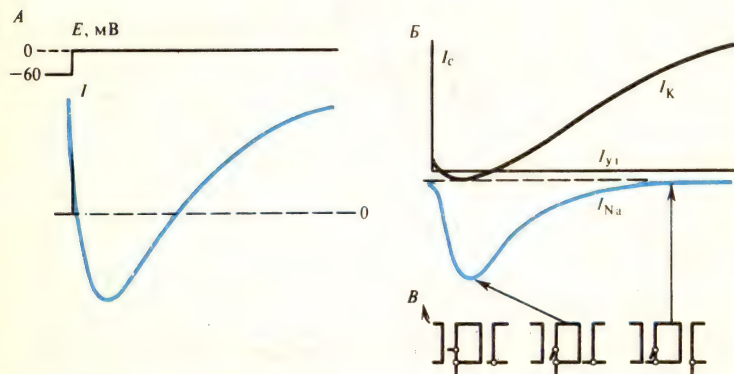


Рис. XXIII.4. Ток, протекающий через мембрану аксона кальмара при ступенчатой деполяризации от уровня потенциала покоя (-60 мВ) до нуля (А); представление полного тока в виде суммы четырех компонентов (Б) и различные состояния воротной системы Na- и K-каналов (по Н. Армстронгу, 1981):

I_c — емкостный ток, I_{Na} — натриевый ток, I_K — калиевый ток, I_y — ток утечки; отклонения вниз соответствуют входящему току, вверх — выходящему

Если потенциал на клеточной мембране не поддерживается на фиксированном уровне, то в период потенциала действия $d\varphi/dt \neq 0$ и через мембрану течет значительный емкостной ток. Важное преимущество метода фиксации потенциала состоит в том, что емкостный ток протекает только в течение очень короткого периода после сдвига мембранного потенциала на заданный уровень. После кратковременного выброса емкостный ток прекращается, так как потенциал на мембране не изменяется ($d\varphi/dt = 0$). Поскольку длительность потенциала действия составляет несколько миллисекунд, важно, чтобы установление потенциала на новом уровне и спад емкостного тока происходили значительно быстрее, например за время порядка десятка микросекунд. Тогда ток, развивающийся после прекращения емкостного тока, будет обусловлен уже только переносом ионов через мембрану.

Физический анализ процесса электрического возбуждения в мембране нервного волокна осложняется распространением нервного импульса по волокну. Чтобы устранить эту трудность и заставить всю мембрану аксона возбуждаться синхронно, внутрь аксона вводят металлический осевой электрод. Введение осевого электрода внутрь аксона позволяет не учитывать кабельные свойства волокна и заменить эквивалентную схему с распределенными емкостью и ионной проводимостью (см. § 9 гл. XXIII) на простую эквивалентную схему (см. рис. XXIII.2).

В ответ на ступенчатую деполяризацию аксона кальмара от потенциала покоя до 0 мВ регистрируется мембранный ток, состоящий из четырех компонентов (рис. XXIII.4). Емкостный ток I_c представляет собой кратковременный импульс, который в основном заканчивается к моменту выхода напряжения на плато. Некоторые дипольные молекулы в мембране медленно меняют свою ориентацию после наложения ступенчатого напряжения, что приводит к появлению небольшого по амплитуде «хвоста» емкостного тока, который спадает

относительно медленно. После спада I_c мембранный ток полностью определяется движением ионов через каналы в мембране.

В ионном токе можно выделить два основных компонента (калиевый и натриевый) и один второстепенный. Последний представляет собой небольшой по значению ток утечки, не меняющийся во времени. Na^+ -ток обусловлен преимущественно кратковременным потоком Na^+ , проходящим через Na^+ -каналы.

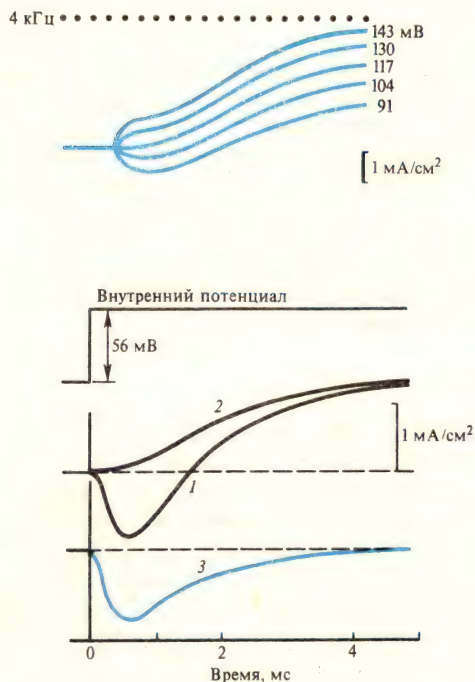


Рис. XXIII.6. Экспериментальное разделение мембранного тока (I) на калиевый и натриевый компоненты (по А. Ходжкину, 1965):

I —аксон находится в морской воде, $I = I_{\text{Na}} + I_{\text{K}}$; 2—большая часть натрия заменена холином, $I = I_{\text{K}}$; 3—разность между 1 и 2, $I = I_{\text{Na}}$, температура $8,5^\circ\text{C}$; отклонение вверх соответствует выходящему току

Рис. XXIII.5. Мембранные токи при различных смещениях мембранного потенциала (температура $3,5^\circ$)

Отклонения вверх соответствуют выходящему току; цифрами обозначена величина смещения мембранного потенциала (по А. Ходжкину, 1965)

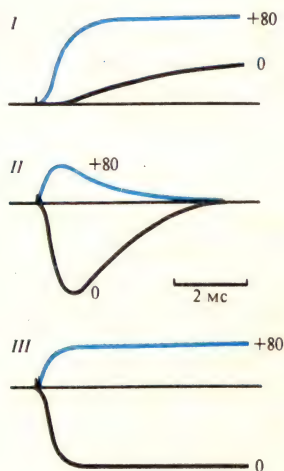


Рис. XXIII.7. Влияние тетродотоксина (ТТХ), тетраэтиламмония (ТЭА) и проназы на ионные токи в мембране аксона, вызываемые смещением мембранного потенциала до 0 и до $+80$ мВ:

I —калиевый ток в аксонах, обработанных ТТХ; II —натриевый ток в аксонах, перфузируемых раствором с добавлением 15 мМ ТЭА; III —то же, что и II , после введения в перфузируемый раствор проназы (2 мг/мл); цифрами у кривых отмечены значения потенциала внутреннего раствора

Этот ток быстро уменьшается и спустя примерно 1 мс сменяется входящим K^+ -током.

Если мембрана деполяризована так, что разность потенциалов равна напряжению натриевой батареи (ϕ_{Na} , равновесный Na^+ -потенциал), то Na^+ -ток отсутствует и наблюдается только K^+ -ток, возникающий с обычной задержкой. При смещении потенциала до положительных значений, превышающих уровень ϕ_{Na} , Na^+ -ток направлен наружу (рис. XXIII.5).

Ионный ток удастся разделить на отдельные компоненты путем замены

Na^+ в среде на непроникающие катионы холина. В этом случае кинетическая кривая включает только K^+ -компонент (рис. XXIII.6).

Разделение тока на компоненты наглядно иллюстрируют опыты с использованием ряда фармакологических агентов. Добавление к аксону малых количеств тетродотоксина (ТТХ) полностью подавляет Na^+ -ток (рис. XXIII.7). Если в аксон кальмара инъецирован или введен с помощью перфузии тетраэтиламмоний (ТЭА) до концентрации 15 мМ, то практически полностью подавляется K^+ -ток. Опыты с использованием ТТХ и ТЭА свидетельствуют о том, что Na^+ - и K^+ -каналы — отдельные структуры, как и предполагается эквивалентной схемой, предложенной в работах А. Ходжкина и А. Хаксли.

Дальнейшее подтверждение существования двух типов каналов получено в опытах с применением проназы. Оказалось, что перфузия аксона раствором с проназой не оказывает влияния на кинетические кривые K^+ -тока, но существенно изменяет кинетику Na^+ -тока. Обработка проназой приводит к подавлению стадии инактивации Na^+ -тока (рис. XXIII.7, III), т. е. к исчезновению стадии быстрого уменьшения Na^+ -тока после достижения пикового значения. Значение тока остается большим на протяжении всего импульса напряжения.

Эквивалентная схема, используемая при интерпретации данных в опытах по фиксации потенциала (см. рис. XXIII.2), предполагает, что токи, текущие по Na^+ - и K^+ -каналам, подчиняются уравнениям

$$I_{\text{Na}} = g_{\text{Na}}(\varphi - \varphi_{\text{Na}}); \quad I_{\text{K}} = g_{\text{K}}(\varphi - \varphi_{\text{K}}). \quad (\text{XXIII.2.3})$$

Если во время развития ионного тока скачком сместить мембранный потенциал на новый уровень, то ток также изменится скачком. Построенные таким способом мгновенные вольт-амперные характеристики мембраны аксона оказались линейными: мгновенный сдвиг ионного тока был пропорционален величине смещения потенциала, что соответствует уравнению (XXIII.2.3). Из соотношений (XXIII.2.3) видно, что изменение тока Na^+ и K^+ во времени в режиме фиксации напряжения обусловлено изменением проводимостей g_{Na} и g_{K} поскольку величина $(\varphi - \varphi_i)$ остается постоянной в течение всего импульса.

Разделив суммарный ионный ток на отдельные компоненты, нетрудно найти кинетические кривые изменений проводимости для каждого иона:

$$g_i = I_i / (\varphi - \varphi_i). \quad (\text{XXIII.2.4})$$

На рис. XXIII.8 показаны вычисленные по (XXIII.2.4) изменения проводимости, вызванные быстрым смещением потенциала внутри волокна от уровня потенциала покоя (-56 мВ) до нуля в экспериментах, приведенных на рис. XXIII.6. Как видно, при ступенчатой деполяризации мембраны Na^+ -проводимость начинает изменяться от чрезвычайно малой величины, быстро нарастает до 25 мСм/см^2 , а затем экспоненциально уменьшается. Проводимость для K^+ нарастает по S-образной кривой и выходит на постоянный уровень через 5—6 мс. Изменения проницаемости для K^+ и Na^+ градуальны и обратимы. Натриевая проводимость восстанавливается примерно в 10 раз быстрее, чем калиевая.

Na^+ -проводимость может быть уменьшена двумя разными способами. Если мембранный потенциал вернуть на исходный уровень через короткий промежуток времени, то система, регулирующая Na^+ -проницаемость, быстро возвращается к состоянию покоя. Второй импульс, нанесенный сразу же после первого, вызывает в этом случае повторное увеличение Na^+ -проводимости. Если же деполяризация продолжительна, Na^+ -проводимость уменьшается более медленно вследствие процесса, называемого инактивацией. Для того чтобы второй импульс после инактивации Na^+ -каналов мог снова вызвать

изменение проницаемости для Na^+ , мембрана в течение нескольких миллисекунд до начала второго импульса должна быть реполяризована. Этот период необходим для выхода из состояния инактивации.

На рис. XXIII.9 представлено семейство кривых, показывающих зависимость проводимости от амплитуды сдвига потенциала и времени после ступенчатого изменения напряжения на мембране. В области порога возбуждения увеличение деполяризации мембраны на 4—6 мВ вызывает быстрое возрастание проводимости.

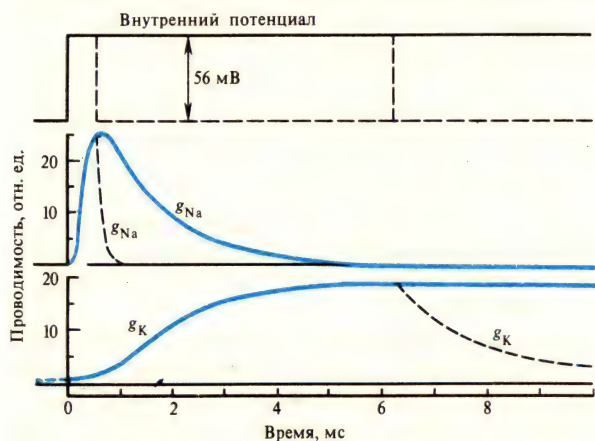


Рис. XXIII.8. Изменение натриевой и калиевой проводимости во времени при деполяризации мембраны на 56 мВ (по А. Ходжкину, 1965)

Сплошными линиями показана проводимость при длительной деполяризации, пунктирными — проводимость при реполяризации мембраны через 0,6 и 6,3 мс

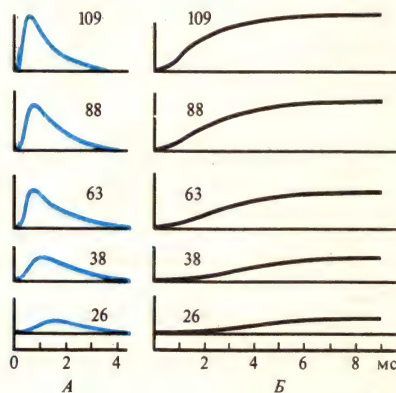


Рис. XXIII.9. Изменение натриевой (А) и калиевой (Б) проводимости мембраны аксона при различных смещениях мембранного потенциала от уровня потенциала покоя

Цифрами обозначена величина деполяризации (мВ)

§ 3. Описание ионных токов в модели Ходжкина — Хаксли

На основе опытов по фиксации напряжения в аксоне кальмара А. Ходжкин и А. Хаксли сформулировали ряд важных принципов. 1. Перенос Na^+ и K^+ осуществляется различными не взаимодействующими структурами. 2. Изменения токов являются следствием изменения проницаемости мембран (для Na^+ и K^+). 3. Пропускная способность мембраны управляется электрическим полем.

А. Ходжкин и А. Хаксли предложили удовлетворительное математическое описание экспериментально наблюдаемой кинетики изменений натриевой и калиевой проводимости при различных смещениях мембранного потенциала (рис. XXIII.9). Модель предполагает, что проводимость мембраны для ионов Na и K регулируется некоторыми управляющими частицами, перемещающимися в мембране при изменениях электрического поля.

Такое перемещение можно представить в виде перескоков положительно заряженных частиц между двумя потенциальными ямами через энергетический барьер с константами скоростей α и β (рис. XXIII.10), которые зависят от высоты энергетического барьера и, следовательно, являются потенциалозави-

симыми. Повышение электрического потенциала с левой стороны мембраны приводит к увеличению константы α и уменьшению константы β .

При ступенчатом изменении разности потенциалов на мембране происходит перераспределение частиц между двумя состояниями. При этом изменяются до новых равновесных значений вероятности заполнения правой и левой потенциальных ям: x и $(1-x)$ соответственно.

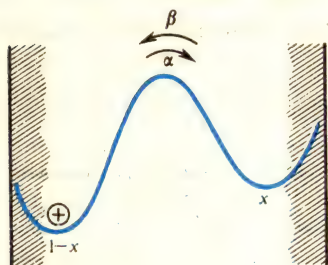


Рис. XXIII.10. Модель, демонстрирующая перемещение заряженных частиц в мембране при изменениях электрического поля:

x — вероятность нахождения частицы в правой стороне мембраны; $(1-x)$ — вероятность нахождения частицы в левой стороне мембраны; α и β — потенциалзависимые константы перехода заряженных частиц через мембрану

Процесс изменения вероятности (x) заполнения правой ямы после ступенчатого сдвига потенциала может быть описан дифференциальным уравнением

$$dx/dt = \alpha(1-x) - \beta x. \quad (\text{XXIII.3.1})$$

Задаваясь граничными условиями: при $t=0$ $x = x_0$ и при $t = \infty$, $x = x_\infty$ — получим

$$x = x_\infty - (x_\infty - x_0)e^{-t(\alpha+\beta)}. \quad (\text{XXIII.3.2})$$

Уравнение показывает, что накопление частиц в правой части мембраны происходит по экспоненциальному закону с постоянной времени τ , где $\tau = 1/(\alpha + \beta)$.

Изменения калиевой проводимости. Если бы канал открывался в результате перехода слева направо только одной активирующей частицы, то проводимость ионных каналов менялась бы во времени также по экспоненте, т. е. можно было бы записать $g_i = xg_i$, где g_i — максимальная проводимость для ионов типа i . Однако наилучшее соответствие кинетической кривой калиевой проводимости в аксоне кальмара достигается при допущении, что для открывания калиевых каналов необходим приход к определенному участку мембраны четырех активирующих частиц.

Пусть n обозначает вероятность того, что одна частица, управляющая K^+ -проницаемостью, находится в правой части мембраны. Тогда вероятность (p) того, что там находится одновременно четыре частицы, равна n^4 . Поэтому K^+ -проводимость мембраны в любой момент времени равна

$$g_K = \bar{g}_K n^4, \quad (\text{XXIII.3.3})$$

где n определяется уравнением типа (XXIII.3.1) и может варьировать в пределах от 0 до 1:

$$dn/dt = \alpha_n(1-n) - \beta_n n. \quad (\text{XXIII.3.4})$$

Частицы, управляющие проницаемостью K^+ -каналов, называют n -частицами.

Рассмотрим простой случай, когда в исходном состоянии все n -частицы находятся с левой стороны мембраны ($n=0$) и K^+ -каналы закрыты. После наложения большой разности потенциалов со знаком плюс по левую сторону мембраны все n -частицы перетекают в правую яму. Кинетика накопления n -частиц в правой части мембраны описывается экспонентой [см. (XXIII.3.2)]

$$n(t) = n_\infty - (n_\infty - n_0)e^{-t/\tau_n}, \quad (\text{XXIII.3.5})$$

где $\tau_n = 1/(\alpha_n + \beta_n)$. Так как в рассматриваемом случае $n_0 = 0$, а $n_\infty = 1$, то

$$n(t) = 1 - e^{-t/\tau_n}.$$

Величина K^+ -проводимости, пропорциональная четвертой степени n , растет уже не по экспоненте, а с большим периодом задержки. Быстрое изменение величин n^4 начинается лишь после того, как значения n превысят 0,7.

Приведенный пример поясняет и способ определения кинетических параметров активации K^+ -проводимости. Для определения постоянной времени активации τ_n необходимо произвести нормировку кинетических кривых проводимости, т. е. построить зависимости $g(t)/\bar{g}_K = n^4$. Затем, извлекая корень четвертой степени, построить зависимость $n(t)$ и определить постоянную времени экспоненты $\tau_n = 1/(\alpha_n + \beta_n)$ для данного уровня мембранного потенциала.

Если приложенная к мембране разность потенциалов недостаточно велика, то не все управляющие частицы переместятся с левой стороны мембраны; это означает, что параметр n не достигнет предельного значения ($n=1$) и K^+ -проводимость установится на уровне меньше максимальной (\bar{g}). Величину n_∞ определяют из эксперимента по формуле

$$n_\infty = (g_\infty / \bar{g})^{1/4}, \quad (\text{XXIII.3.6})$$

где g_∞ — стационарный уровень K^+ -проводимости при данном потенциале, \bar{g} — максимальная K^+ -проводимость.

Из уравнения (XXIII.3.4) следует, что в равновесии ($dn/dt=0$)

$$n_\infty = \alpha_n / (\alpha_n + \beta_n).$$

Таким образом, из семейства кинетических кривых K^+ -проводимости (см. рис. XXIII.9, Б) можно отыскать значения констант скоростей α и β при разных потенциалах, используя систему уравнений

$$\tau = 1/(\alpha + \beta); \quad n_\infty = \alpha/(\alpha + \beta). \quad (\text{XXIII.3.7})$$

Как видно из (XXIII.3.7), $\alpha = n_\infty / \tau$.

Изменения натриевой проводимости. Кинетические кривые Na^+ -проводимости имеют более сложную форму (см. рис. XXIII.9, А): проводимость нарастает до максимума — активация, а затем снижается — инактивация. Изменение Na^+ -проводимости удалось описать на основе предположения о наличии активирующих m -частиц и инактивирующих h -частиц. Предполагают, что для открывания канала необходимо поступление в определенный участок мембраны трех m -частиц. Переход через мембрану одной инактивирующей частицы вызывает блокировку канала. Таким образом, изменения Na^+ -проводимости описывают уравнением

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h, \quad (\text{XXIII.3.8})$$

где \bar{g}_{Na} — максимальная Na^+ -проводимость, m — вероятность нахождения в заданном участке мембраны одной m -частицы, h — вероятность того, что инактивирующая частица в этом участке отсутствует. При наложении поля, перемещающего заряженные частицы с левой стороны мембраны (рис. XXIII.10) на правую, m возрастает в пределах от 0 до 1, а h снижается (в пределе до 0).

Кинетика перераспределения частиц через мембрану при наложении электрического поля описывается одностепенными уравнениями

$$dm/dt = \alpha_m(1-m) - \beta_m m; \quad dh/dt = \alpha_h(1-h) - \beta_h h, \quad (\text{XXIII.3.9})$$

где α и β — константы скорости, зависящие только от мембранного потенциала (при постоянной температуре и концентрации Ca^{2+}). Решение этих уравнений

имеет вид

$$m = m_{\infty} - (m_{\infty} - m_0) e^{-t/\tau_m}, \quad \text{где } \tau_m = 1/(\alpha_m + \beta_m);$$

$$h = h_{\infty} - (h_{\infty} - h_0) e^{-t/\tau_h}, \quad \text{где } \tau_h = 1/(\alpha_h + \beta_h). \quad (\text{XXIII.3.10})$$

Значения m_{∞} и h_{∞} определяются из граничных условий

$$m_{\infty} = \alpha_m/(\alpha_m + \beta_m); \quad h_{\infty} = \alpha_h/(\alpha_h + \beta_h). \quad (\text{XXIII.3.11}).$$

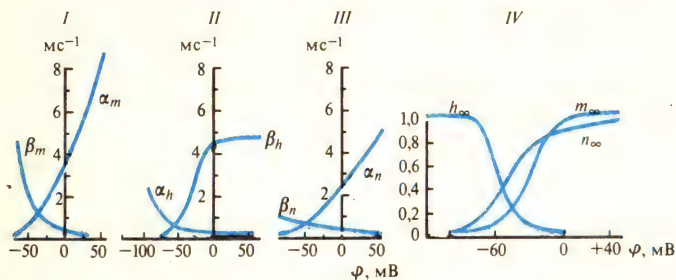


Рис. XXIII.11. Зависимость констант α и β от мембранного потенциала (I, II, III) и стационарных значений m , h , n от мембранного потенциала (IV)

В результате анализа кинетических кривых активации и инактивации Na^+ -проводимости А. Ходжкин и А. Хаксли построили графические зависимости параметров α_m , β_m , α_h , β_h , а также m_{∞} и h_{∞} от мембранного потенциала (рис. XXIII.11) и подобрали эмпирические соотношения, описывающие ход указанных зависимостей.

Из приведенных на рис. XXIII.11 кривых видно, что стационарный K^+ -ток имеет место в широкой области потенциалов, тогда как стационарный Na^+ -ток ограничен узкой областью, где m^3 и h одновременно отличны от нуля.

На основе рассмотренной математической модели А. Ходжкину и А. Хаксли удалось с высокой точностью воспроизвести нервный импульс, генерируемый мембраной аксона в различных экспериментальных условиях. После незначи-

тельной модификации модели был имитирован процесс электрического возбуждения в миелинизированных нервных волокнах (Б. Франкенхаузер) и соматических нервных клеток (П. Г. Костюк, О. А. Крысталль).

Разделение трансмембранных токов на отдельные компоненты сыграло чрезвычайно важную роль для понимания механизмов электрической возбудимости мембран: охарактеризованы селективность, потенциалозависимость, кинетика включения и выключения внутримембранных путей — ионных каналов. В результате созданы общие представления о структурно-функциональной организации Na^+ - и K^+ -каналов, управляемых изменениями электрического поля (рис. XXIII.12); выделены функциональные элементы ионных каналов,



Рис. XXIII.12. Строение ионного канала (по Б. Хилле, 1981)

ответственные за механизмы селекции,—селективный фильтр, активации — «активационные ворота» и инактивации — «инактивационные ворота».

§ 4. Токи ворот

Простейшая физическая интерпретация уравнений Ходжкина — Хаксли, описывающих зависимость проводимости возбудимых мембран от потенциала, предполагает наличие в мембране подвижных заряженных частиц n , m и h ,

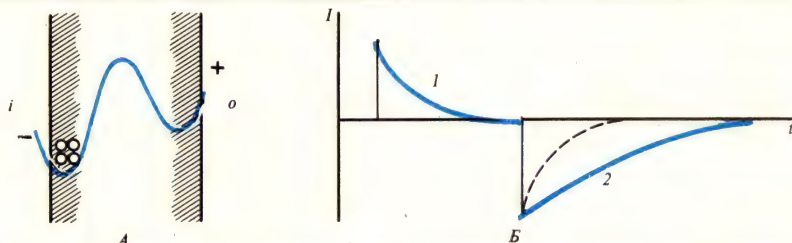


Рис. XXIII.13. Асимметричный ток смещения в мембране, содержащей подвижные заряженные частицы. А—асимметричное распределение частиц в мембране в исходном состоянии; Б—кинетика емкостного тока при наложении гиперполяризующих (1) и деполяризующих (2) импульсов напряжения

Пунктиром обозначены изменения емкостного тока при отсутствии в мембране подвижных зарядов; i , o —внутренняя и наружная стороны мембраны

которые перераспределяются в мембране под действием электрического поля и переводят канал в проводящее или непроводящее состояние.

Исходя из эмпирических зависимостей, представленных на рис. XXIII.11, можно показать, что отношение констант скоростей переходов m -частиц через мембрану зависит от потенциала в соответствии с формулой

$$\beta_m / \alpha_m \simeq e^{-3,9F\varphi/(RT)} \sim e^{-4F\varphi/(RT)}. \quad (\text{XXIII.4.1})$$

Исходя из (XXIII.4.1) был сделан вывод, что заряд частиц, управляющих Na^+ -проводимостью, составляет ~ 4 .

Если в мембране действительно находятся заряженные частицы, способные перемещаться в электрическом поле, то, очевидно, можно зарегистрировать ток, обусловленный перемещением этих воротных частиц. Недавно удалось экспериментально обнаружить движение воротного заряда, или воротный ток.

Суть эксперимента состоит в следующем. Если мембрана представляет собой идеальный диэлектрик, то при наложении ступенчатого импульса напряжения через нее в первые моменты времени протекает емкостный ток, или ток смещения, значение и кинетика которого не зависят от полярности приложенного импульса. Иная ситуация возникает в том случае, если в мембране содержатся заряженные частицы, способные перемещаться в электрическом поле, причем в исходном состоянии распределение подвижных частиц асимметрично.

Предположим для определенности, что в исходном состоянии все воротные частицы находятся на левой (внутренней) стороне мембраны, имеющей более низкий потенциал (рис. XXIII.13). Если мембрану гиперполяризовать, наложив ступенчатый импульс напряжения той же полярности, что и существующий потенциал, то через нее потечет емкостный ток точно такой же, как и в отсутствие воротных частиц. Однако при наложении напряжения противоположной по-

лярности помимо основного компонента емкостного тока возникает дополнительный ток, обусловленный смещением воротных частиц слева направо. Значение этого тока может оказаться весьма малым по сравнению с основным компонентом тока.

Комбинируя методы внутриклеточной перфузии, фиксации потенциала и синхронного накопления сигнала, К. Армстронг и Ф. Безанилла обнаружили на гигантском аксоне кальмара малый асимметричный ток смещения, связанный предположительно с активацией Na^+ -каналов.

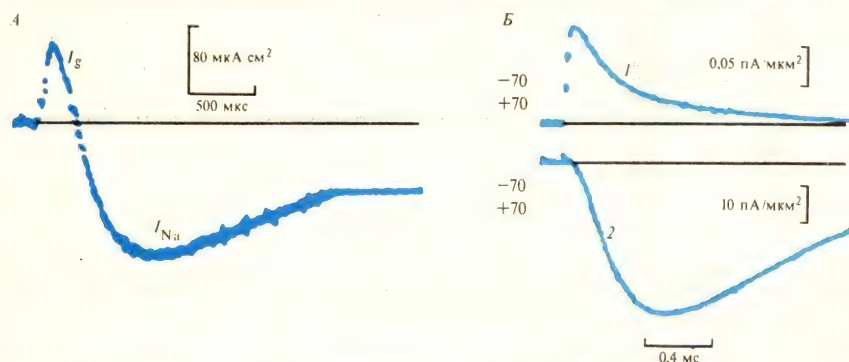


Рис. XXIII.14. Воротный ток (I_g) и натриевый ток (I_{Na}) в аксоне кальмара: А—95% Na^+ заменено на ионы триса; Б—воротный ток в условиях полной замены Na^+ на трис (I), Na^+ -ток, записанный на том же аксоне в обычных условиях в морской воде (2)

Основная трудность при регистрации воротных токов состоит в том, что необходимо исключить или свести к минимуму влияние ионных токов, обычного емкостного тока, а также шумов. Для исключения ионного тока аксон кальмара перфузировали снаружи и изнутри растворами, содержащими непроницающие ионы, а также блокаторы ионных токов — тетродотоксин и тетраэтиламмоний. С помощью цифрового накопителя или ЭВМ производили суммирование кривых тока, полученных в режиме фиксации потенциала в ответ на приложение к мембране одинакового числа равных по амплитуде гиперполяризующих и деполаризующих импульсов. Любой остающийся в результате этой операции емкостный ток является асимметричным и может быть воротным током.

Воротный ток в сравнении с током Na^+ показан на рис. XXIII.14. В приведенном опыте 95% Na^+ в наружном растворе заменены на ионы триса. Из рис. XXIII.14 видно, что Na^+ -току, значение которого в этих условиях значительно меньше, чем обычно, предшествует кратковременный выходящий ток (воротный ток). Если из раствора удалены все ионы Na , то становится заметным, что воротный ток медленно спадает после начального пика и в основном прекращается к моменту достижения пика Na -тока в обычном растворе (рис. XXIII.14, Б).

Характерной особенностью асимметричных токов смещения является их экспоненциальная зависимость от времени, что соответствует модели Ходжкина — Хаксли. Анализ характерного времени релаксации асимметричного тока в зависимости от потенциала показал, что это время примерно совпадает с временем $\tau_m(\varphi)$ в модели Ходжкина — Хаксли. Совпадение свидетельствует о связи асимметричных токов смещения с частицами, открывающими Na^+ -канал.

В дальнейшем были найдены дополнительные доводы в пользу прямой связи асимметричных токов смещения с движением воротных частиц.

1. Заряд, переносимый асимметричным током смещения при включении деполяризации, равен заряду, переносимому этим током при последующей реполяризации. Однако указанное равенство соблюдается лишь при коротких деполяризующих сдвигах. Если деполяризация длится относительно долго, то происходит так называемая иммобилизация воротных зарядов, в результате чего ток, текущий при реполяризации, становится меньше тока, переносимого при деполяризации.

2. Зависимость перенесенного заряда от потенциала качественно соответствует зависимости Na^+ -проводимости от потенциала (см. ниже).

3. Величина переносимого заряда практически не зависит от температуры, хотя кинетика тока смещения резко замедляется с понижением температуры. Температурный коэффициент Q_{10} для времени релаксации асимметричного тока смещения равен трем, что совпадает с величиной Q_{10} для τ_m .

4. Воротный ток и Na^+ -проводимость подавляются ионами Zn , введенными внутрь клетки, а также действием ультрафиолетового света с длиной волны 280 нм.

Важным подтверждением в пользу того, что асимметричный ток смещения связан с активацией входящего Na^+ -тока, явилось сравнение экспериментально измеряемой и теоретической зависимостей смещенного заряда от значения мембранного потенциала. Исходя из эксперимента, величину смещенного заряда можно найти, интегрируя воротный ток по времени:

$$Q = \int_0^\infty i(t) dt. \quad (\text{XXIII.4.2})$$

Пример такой зависимости приведен на рис. XXIII.15; здесь по оси ординат отложена величина смещенного заряда в нКл/см². Иногда измеряют зависимость от потенциала величины $\Theta = Q/Q_{\max}$, показывающей долю смещенных зарядов по отношению к максимально возможному перенесенному заряду.

Теоретическую зависимость Θ от значения мембранного потенциала можно получить, записывая условие равновесного распределения заряженных воротных частиц между двумя возможными состояниями. Распределение частиц при наличии на мембране разности потенциалов ϕ описывается уравнением Больцмана

$$1 - \Theta = \Theta e^{-zF\phi/(RT)}, \quad (\text{XXIII.4.3})$$

где $(1 - \Theta)$ — заполнение левой потенциальной ямы, а Θ — заполнение правой ямы. Из (XXIII.4.3) следует, что количество частиц, перемещенных в мембране слева направо, равно

$$\Theta = 1 / (1 + e^{-zF\phi/(RT)}). \quad (\text{XXIII.4.4})$$

График этой теоретической зависимости смещенного заряда от мембранного потенциала, рассчитанный по (XXIII.4.4), показан на рис. XXIII.16.

Воротные токи в простейшей интерпретации рассматривают как следствие перескока m -частиц в процессе активации Na^+ -каналов мембраны. Однако

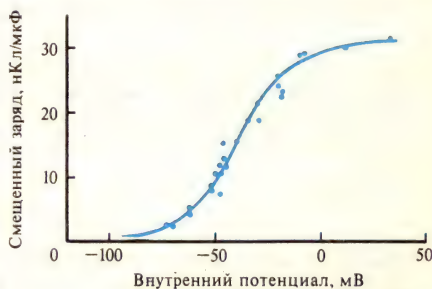


Рис. XXIII.15. Зависимость смещенного заряда в мембране мышцы лягушки от приложенного потенциала (по Алмерсу, 1981)

перескок нескольких заряженных групп через всю толщу мембраны выглядит маловероятным. Скорее всего токи смещения обусловлены относительно небольшими смещениями заряженных групп в воротном устройстве канала. Тем не менее если предположить, что m -частицы испытывают только небольшие смещения (порядка нескольких десятых нанометров), то окажется, что перепад

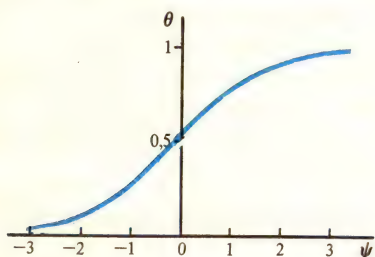


Рис. XXIII.16. Смещенный заряд как функция потенциала:
 $Q = Q/Q_{\max}$, ψ — безразмерный потенциал

энергии между двумя устойчивыми состояниями для воротных частиц крайне мал и составляет $\varphi z F \delta / h$, где h — толщина мембраны, δ — расстояние, на которое могут перемещаться воротные частицы. Однако в этом случае величина смещенного заряда, определяемая по формуле

$$Q/Q_{\max} = 1/(1 + e^{-zF\varphi\delta/(RT h)}), \quad (\text{XXIII.4.5})$$

становится слабо чувствительной к изменению мембранного потенциала, что противоречит регуляторной функции частиц. Это противоречие может указывать на то, что в действительности заряженные воротные группы обладают исключительно высокой величиной валентности. Другая возмож-

ность, устраняющая указанное противоречие, состоит в том, что мембрана в области локализации канала обладает настолько небольшой толщиной, что перепад потенциала φ/h в (XXIII.4.5) на единицу длины в этой области значительно выше, чем в области липидного бислоя.

§ 5. Дипольная модель канала

Природа воротных токов может состоять в том, что асимметричный ток смещения обусловлен не перемещением заряженных групп через мембрану, а кооперативным изменением ориентации диполей, выстилающих внутреннюю полость канала. Прохождение иона через канал зависит от его взаимодействия с дипольными группировками, которое определяет электростатическую энергию иона (см. § 5 гл. XX). Переориентация диполей может существенно изменить энергию взаимодействия иона с окружением в канале и тем самым вероятность попадания иона в канал. Кроме того, изменение ориентации диполей может сопровождаться конформационной перестройкой, изменяющей геометрию канала, что может также сказаться на концентрации ионов в канале и их подвижности, т. е. на пропускной способности канала.

Известны свойства одиночного жесткого диполя, находящегося во внешнем электрическом поле (рис. XXIII.17).

Рассмотрим систему взаимодействующих диполей канала, каждый из которых может находиться в двух ориентациях, отличающихся по проекции дипольного момента на ось канала (рис. XXIII.18). Энергия диполя в рассматриваемой системе складывается из нескольких компонентов: стандартной химической энергии U_0 , энергии взаимодействия диполя с внешним электрическим полем (см. рис. XXIII.17) и энергии взаимодействия диполя с другими диполями системы. Если липопротеиновый комплекс, содержащий рассматриваемую систему диполей, является достаточно жестким, то процесс переориентации отдельных диполей будет кооперативным. Это означает, что энергия, необходимая для переориентации каждого элементарного диполя в системе, зависит не только от его собственной энергии, но и от доли диполей, уже изменивших свою ориентацию. Тогда изменение энергии элементарного

диполя при его переориентации будет зависеть от доли переориентированных диполей (Θ) и составлять величину $-\Theta(W_2 - W_1) = \Theta W$, где W_1 и W_2 — параметры взаимодействия диполя в двух его ориентациях с системой окружающих диполей.

Если стандартные свободные энергии диполя для обеих ориентаций одинаковы, то разность энергетических уровней между двумя состояниями,

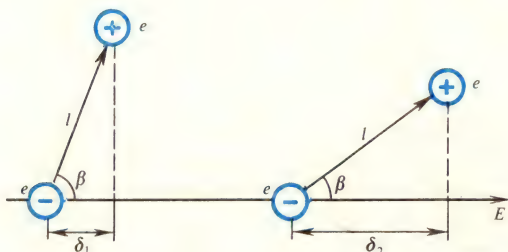


Рис. XXIII.17. Диполь в электрическом поле

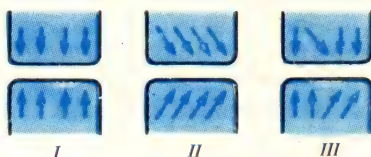


Рис. XXIII.18. Дипольная модель регуляции проводимости ионного канала:

I, II — все диполи, выстилающие внутреннюю полость канала, занимают одну из возможных ориентаций; III — смешанное состояние

Равные по величине и противоположные по знаку электрические заряды $+e$ и $-e$ расположены на расстоянии l друг от друга. Электрический момент диполя представляет собой вектор с модулем el . Проекция дипольного момента на вектор напряженности поля равна $el \cos \beta = ed$. Энергия (W) диполя в электрическом поле равна произведению проекции дипольного момента на напряженность поля (E): $W = -edE = -e\delta\varphi/h$, где φ — разность электрических потенциалов на мембране, имеющей толщину h . Знак минус показывает, что устойчивым положением диполя является расположение его вектора по направлению электрического поля. Изменение энергии при повороте одиночного диполя в электрическом поле составляет $\Delta W = (e\varphi/h)(\delta_2 - \delta_1) = -e\varphi$, где ε — коэффициент $\varepsilon = e(\delta_2 - \delta_1)/h$

складывающаяся из изменения энергии взаимодействий с внешним полем $e\varphi$ (см. рис. XXIII.17) и другими диполями системы, составит $-e\varphi - \Theta W$. В условиях равновесия доли диполей, находящихся в переориентированном состоянии Θ и в исходном состоянии $(1 - \Theta)$, связаны между собой соотношением Больцмана. Отсюда следует, что отношение заселенностей энергетических уровней двух ориентаций Θ и $1 - \Theta$ экспоненциально зависит от разности энергий между этими уровнями $(-e\varphi - W\Theta)$:

$$\frac{\Theta}{1 - \Theta} = k_0 e^{\frac{e\varphi + W\Theta}{k_B T}}, \quad (\text{XXIII.5.1})$$

где k_0 — константа. Таким образом, доля диполей, находящихся в каждом из состояний, зависит от мембранного потенциала, и эта зависимость описывается соотношением

$$\frac{\Theta}{1 - \Theta} e^{-\omega\Theta} = k_0 e^{\varepsilon_1 \Psi}, \quad (\text{XXIII.5.2})$$

где $\omega = W/(k_B T)$ — параметр кооперативности, $\Psi = e\varphi/(k_B T)$ — безразмерный потенциал, $\varepsilon_1 = \varepsilon/e$.

Полученное уравнение при подборе параметров ω и ε_1 позволяет описать экспериментально наблюдаемую зависимость смещенного заряда от мембранного потенциала. Действительно, поворот диполя сопровождается некоторым эффективным смещением заряда вдоль оси канала, поэтому величина Θ ,

означающая долю диполей, которые находятся в одном из состояний, может рассматриваться как показатель перенесенного в мембране заряда. При $\omega = 3,5$ зависимость Θ от мембранного потенциала, рассчитанная по уравнению (XXIII.5.2), хорошо согласуется с экспериментом (см. рис. XXIII.16).

Рассмотренный электростатический механизм регуляции проводимости канала за счет поворота мембранных диполей может в принципе обеспечить наблюдаемую зависимость проводимости от потенциала. Однако в этом случае проводимость одиночного канала также должна непрерывно зависеть от поля, а не претерпевать скачкообразные переходы между открытым и закрытым состояниями (см. § 5 гл. XXI). Вместе с тем если поворот диполей в мембране сопровождается конформационным изменением канала, то скачкообразные изменения проводимости в одиночном канале также вполне возможны.

Предполагают, что дипольный механизм регуляции лежит в основе потенциалозависимости проводимости БЛМ, модифицированных грамицидином А. Согласно предположению Д. Урри, существует равновесие между проводящей и непроводящей конформациями молекулы грамицидина, причем проводящая π_{LD}^6 -спираль имеет больший дипольный момент (см. § 3 гл. XXI). Различие дипольных моментов для двух конформаций, создаваемое одним витком спирали (шаг спирали 0,45 нм), составляет $15 \cdot 10^{-18}$ ед. СГСЭ·см, или 15 D. Различие дипольных моментов для трансмембранной структуры длиной 3 нм, способной образовать ионный канал, составит $100 \cdot 10^{-18}$ ед. СГСЭ·см, или 100D. Разность энергии диполей, соответствующих двум конформациям, во внешнем электрическом поле рассчитывают по формуле (см. рис. XXIII.17):

$$\Delta W = \mu F E / e, \quad (\text{XXIII.5.3})$$

где μ — дипольный момент, e — заряд электрона ($4,8 \cdot 10^{-10}$ ед. СГСЭ), F — число Фарадея ($96\,500$ Кл/моль $= 96,5$ кДж·В $^{-1}$ ·моль $^{-1}$), E — напряженность электрического поля, В/см. При толщине мембраны 3 нм и разности потенциалов 0,1 В, $E = 0,1/(3 \cdot 10^{-7})$ В/см, разность энергии ΔW в (XXIII.5.3) составляет 6,7 кДж/моль. Если предполагать, что в отсутствие электрического поля вероятности каждой из двух конформаций одинаковы, то при наложении на БЛМ разности потенциалов в 100 мВ соотношение числа непроводящих и проводящих структур изменится примерно на порядок в соответствии с формулой Больцмана $N_1/N_2 = e^{-\Delta W/(RT)}$, где $RT \approx 2,5$ кДж/моль.

Согласно другой модели, молекулы грамицидина находятся в конфигурации α -спирали и могут располагаться на поверхности мембраны или поперек нее (рис. XXIII.19). Погружению мономеров в толщу мембраны препятствуют полярные группы, которые в случае конфигурации π_{LD}^6 -спирали образуют внутримолекулярные водородные связи между отдельными витками. Однако внешнее электрическое поле, взаимодействующее с дипольным моментом α -спирали полипептидной цепи, стремится ориентировать молекулы перпендикулярно плоскости мембраны. Расчеты показывают, что разность энергий для двух ориентаций диполя мономерной формы грамицидина составляет примерно 4,2 кДж/моль. Выигрыш в энергии, создаваемый поворотом диполя в электрическом поле, недостаточен для того, чтобы «затащить» полярные группы мономера в мембрану. Однако если образуется тример или комплекс из шести мономеров, в котором параллельные цепи грамицидина связываются поперечными межцепочечными водородными связями и образуют структуры типа складчатого слоя (β -структуры), то разность электрической энергии таких диполей при различной ориентации во внешнем поле будет составлять 12,6 и 25,2 кДж/моль соответственно. Поскольку в таких комплексах боль-

шинство полярных групп объединено водородными связями и молекулы могут свободно погружаться в липидный бислой, электрическое поле оказывается эффективным регулятором ориентации комплексов. В случае формирования сквозной поры комплексов из шести мономеров наложение разности потенциалов в 0,1 В должно изменить соотношение молекул, ориентированных параллельно и перпендикулярно плоскости мембраны, в 10^3 раз.

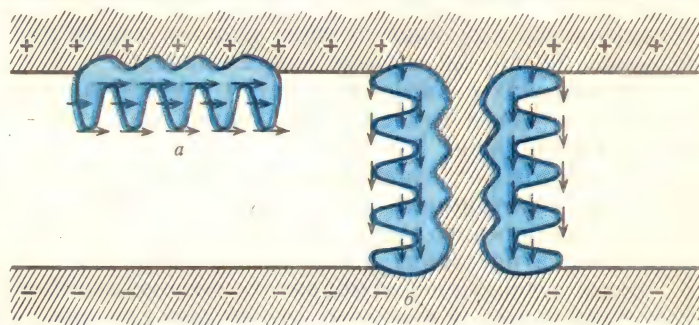


Рис. XXIII.19. Модель формирования канала из параллельно соединенных субъединиц:

a и *б* — полипептидная цепь в разных ориентациях; стрелками показана ориентация диполей; под влиянием поля полипептидные цепи занимают преимущественно положение *б*

§ 6. Кальциевая проводимость электровозбудимых мембран

Исследования на различных мышечных волокнах показали участие ионов Ca^{2+} в генерации потенциала действия. Так, на мышечных волокнах ракообразных при помещении их в безнатриевые растворы и блокировании K^+ -проводимости ТЭА наблюдались длительные потенциалы действия, зависящие от наличия Ca^{2+} в среде.

В гладкомышечных клетках млекопитающих потенциалы действия и соответствующие ионные токи сильно зависят от наружной концентрации Ca^{2+} и подавляются ионами Mn , Co и La , которые прочно связываются с рецептором Ca^{2+} -канала. Потенциалы действия гладкомышечных клеток не подавляются ТТХ и сохраняются при полном удалении из среды Na^+ .

С использованием белка экворина, светящегося в присутствии следовых количеств Ca^{2+} , удалось показать, что поступление Ca^{2+} в аксон при возбуждении происходит в две фазы. Первая фаза совпадает по времени с входящим Na^+ -током и блокируется ТТХ. Вторая фаза, длительно длится несколько секунд, нечувствительна к ТТХ и ТЭА, но подавляется при введении в среду ионов Mn , а также верапамила и ингибитора Ca^{2+} -канала — *D*-600. Очевидно, быстрый Ca^{2+} -ток обусловлен переносом Ca^{2+} по Na^+ -каналам, а медленный — активацией небольшого числа специфических Ca^{2+} -каналов. Ca^{2+} -каналы обнаружены также в пресинаптических мембранах отростков двигательных нейронов.

Механизмы электрической возбудимости изолированных нейронов моллюсков имеют существенные особенности в сравнении с механизмом генерации потенциала действия в мембране аксона. Развитие методов внутриклеточного диализа изолированных нейронов позволило охарактеризовать систему ионных каналов сомы нервной клетки (П. Т. Костюк, О. А. Крышталь). В нейронах, диализируемых трисфосфатом, выходящие токи подавлены и наблюдается только входящий ток, включающий два кинетических компонента. Быстрый входящий ток обусловлен активацией Na^+ -каналов, а медленный входящий ток — активацией Ca^{2+} -каналов. Входящий Ca^{2+} -ток нечувствителен

к действию ТТХ и ТЭА, но подавляется ионами Cd , Mn , Co , Ni , La , а также верапамилом и D -600. Кроме того, входящий Ca^{2+} -ток подавляется при внутриклеточном диализе нейрона раствором, содержащим анионы F^- в концентрации около 20 мМ.

Выходящие токи в мембране нейронов моллюсков также включают два компонента. Быстрый выходящий ток переносится K^+ ; этот ток подавляется при внутриклеточном введении ТЭА, а также при добавлении в среду 4-аминопиридина в концентрации около нескольких миллимоль. Переносчиком задержанного выходящего тока, видимо, также являются ионы K , транспортируемые по другой системе ионных каналов.

В нейронах позвоночных, как и в нейронах моллюсков, существуют входящий Na^+ -ток и медленный входящий Ca^{2+} -ток, а также быстрый и задержанный выходящие K^+ -токи.

С работой Ca^{2+} -зависимых ион-транспортных систем тесно связана электрическая возбудимость эмбриональных клеток. Так, потенциалы действия яйцеклеток морского червя *Chaetopterus* до начала деления являются Ca^{2+} -зависимыми, а на стадии реснитчатого эмбриона становятся Na^+ -зависимыми. В опытах с фиксацией мембранного потенциала на ооцитах оболочников, морских ежей и мышей показано, что во всех случаях имеются быстрый входящий ток Na^+ и медленный входящий ток Ca^{2+} , причем Ca^{2+} -ток блокируется при внутриклеточном введении F^- .

Роль Ca^{2+} в электрической возбудимости клеток не исчерпывается переносом тока по Na^+ - и Ca^{2+} -каналам. Сорбируясь на мембране в области входного участка канала, ионы Ca могут затруднять доступ в канал другим ионам за счет изменения поверхностного заряда.

Кальций регулирует активность ряда ферментов, обеспечивающих поддержание функционально активного состояния канала. Так как внутриклеточная концентрация Ca^{2+} очень низка (10^{-6} М), она может измениться даже за счет небольших потоков, связанных с генерацией потенциала действия.

Механизм регуляторного действия Ca^{2+} на внутриклеточном уровне в настоящее время еще не выяснен. Взаимодействуя с кальмодулином, Ca^{2+} может действовать на систему циклических нуклеотидов, активируя фосфодиэстеразу и понижая концентрацию цАМФ. Тем самым Ca^{2+} влияет на предполагаемое цАМФ-зависимое фосфорилирование канальных белков и функциональное состояние канала. Существуют предположения, что Ca^{2+} -зависимая активация аденилатциклазы, другого основного фермента системы циклических нуклеотидов, представляет важное звено в механизме мембранной рецепции: рецепторы, взаимодействуя с соответствующим медиатором, вызывают поступление Ca^{2+} в цитоплазму и, как следствие, повышение внутриклеточного уровня цАМФ.

В возбудимых клетках харовых водорослей Ca^{2+} выступает в качестве активатора хлорных каналов. При деполяризации плазмалеммы ионы Ca поступают по Ca^{2+} — Na^+ -каналам из среды в цитоплазму и активируют Cl^- -каналы плазмалеммы и тонопласта, в результате чего Cl^- начинает выходить из клетки в среду. Поступление в клетку Ca^{2+} и выход из нее Cl^- определяют появление быстрого и медленного компонентов входящего тока, которые разделяются по потенциалам реверсии, а также по чувствительности к ряду ингибиторов.

Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может быть обусловлено не только поступлением его из среды, но и выбросом из внутриклеточных органелл. Так, предполагают, что цАМФ может вызывать выброс Ca^{2+} из митохондрий, которые служат депо кальция.

Ионы Ca не принимают непосредственного участия в воротном процессе.

Мышечные волокна продолжают генерировать потенциалы действия и сокращаться даже после понижения наружной концентрации Ca^{2+} до $\sim 10^{-9}$ М.

§ 7. Физико-химические модели возбуждения. Осциллятор Теорелла

Среди различных моделей электрической возбудимости клеток особый интерес представляет предложенная в конце 50-х годов Т. Теореллом физико-химическая модельная система, названная мембранным осциллятором. Модель представляет собой две ячейки, заполненные электролитом разной концентрации и разделенные мембраной из пористого стекла с фиксированными отрицательными зарядами. При пропускании через мембрану тока в ячейках возникает отчетливый сдвиг уровней жидкости, т. е. создается перепад гидростатических давлений. Пока ток не превышает некоторого критического значения, разность потенциалов на мембране и перепад давлений остаются постоянными. Однако после превышения критического значения тока система переходит в автоколебательный режим, при котором разность потенциалов на мембране и разность давлений начинают совершать релаксационные колебания.

В основе работы мембранного осциллятора лежат электрокинетические явления (см. § 5 гл. XVIII). Суммарный поток жидкости по капиллярам пористой мембраны представляет собой разность электроосмотического потока (его направление совпадает с направлением электрического поля) и встречно направленного гидродинамического потока.

Если поток направлен так, что мембрана заполняется концентрированным раствором электролита, то сопротивление мембраны резко снижается, и, наоборот, если мембрана заполняется малопроводящим разбавленным раствором, ее сопротивление возрастает. В зависимости от направления движения жидкости профиль концентрации внутри мембраны приобретает

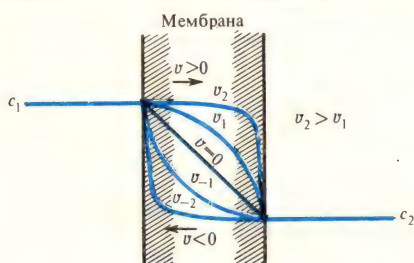


Рис. XXIII.20. Распределение концентрации ионов внутри мембраны в зависимости от направления и скорости протекания жидкости:

c_1, c_2 — концентрации электролита в водных растворах, v — скорость движения иона через мембрану, v_1, v_2, v_{-1}, v_{-2} — скорости при разных значениях потоков

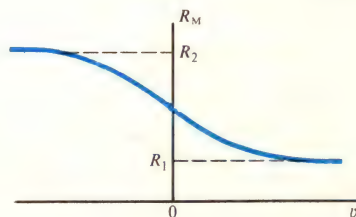


Рис. XXIII.21. Зависимость сопротивления мембраны R_m от скорости потока жидкости (v)

вогнутую или выпуклую форму, соответствующую низкой и высокой концентрации носителей заряда в мембране (рис. XXIII.20). С увеличением скорости течения профиль концентрации в мембране приближается к прямоугольному. При высоких скоростях течения сопротивление мембраны принимает одно из двух предельных значений в зависимости от направления потока раствора (рис. XXIII.21).

Скорость течения жидкости (v) через мембрану зависит от разности давлений p и разности потенциалов ϕ следующим образом:

$$v = \alpha p - \beta \phi, \quad (\text{XXIII.7.1})$$

где α и β — коэффициенты пропорциональности. Первый член описывает фильтрационное течение через пористую среду, второй — соответствует электроосмотическому потоку.

В теории мембранного осциллятора доказывается, что при достаточно высоких скоростях $|v| \gg D/h$ (D — коэффициент диффузии токопереносящих ионов внутри мембраны, h — толщина мембраны) большая часть мембраны заполнена электролитом одной и той же концентрации c_1 или c_2 в зависимости от направления потока. Лишь при малых значениях скорости концентрация плавно изменяется от одного значения к другому. В связи с этим можно считать, что концентрация в мембране равна c_1 , если $v > 0$, и c_2 , если $v < 0$.

Отсюда следует, что вольт-амперная характеристика мембраны состоит из двух линейных участков с резким переходом между ними (рис. XXIII.22). Наклоны участков определяются сопротивлением электролита в мембране при c_1 и c_2 , а переход между участками происходит при потенциале ϕ , соответствующем нулевой скорости течения. Реальная вольт-амперная характеристика,

полученная методом фиксации потенциала (пунктир на том же рисунке), отличается лишь тем, что вместо резкого перехода имеется довольно крутой участок с отрицательным наклоном.

Существование этого участка создает предпосылки для возникновения колебаний в системе. В некоторых пределах каждому значению тока соответ-

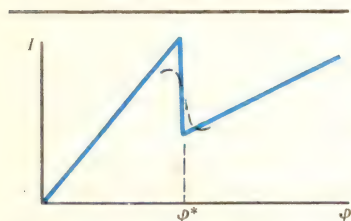


Рис. XXIII.22. Вольт-амперная характеристика мембранного осциллятора:

I — электрический ток, ϕ — потенциал, ϕ^* — критический потенциал, соответствующий нулевой скорости течения

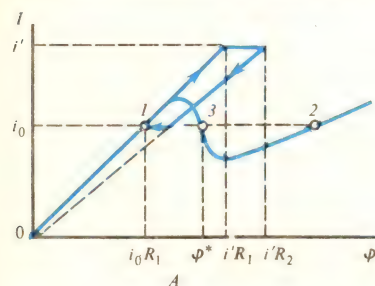
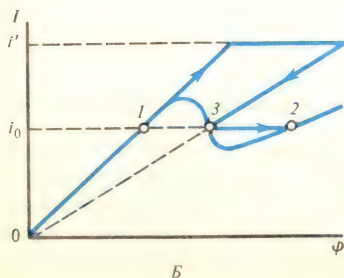


Рис. XXIII.23. Переход между двумя устойчивыми состояниями в модели Теорелла:

1, 2 — устойчивые состояния, 3 — неустойчивое



При возрастании тока i_0 до i' потенциал на мембране (ϕ) скачком возрастает от i_0R_1 до $i'R_1$, где R_1 — сопротивление мембраны в состоянии 1. Увеличение потенциала приводит к уменьшению скорости движения раствора через мембрану в соответствии с формулой (XXIII.7.1); мембрана заполняется обедненным раствором, и ее сопротивление возрастает. По завершении импульса ток мгновенно уменьшается от i' до i_0 , одновременно происходит падение потенциала до $i'R_2$. Здесь R_2 — максимальное значение сопротивления, достигнутое за время приложения импульса тока. Дальнейшее поведение потенциала на мембране зависит от соотношения i_0R_2 и ϕ^* . Если $i_0R_2 > \phi^*$, потенциал продолжает расти и система переходит в состояние 2 (Б). Если же $i_0R_2 < \phi^*$, система возвращается в исходное состояние 1 (А)

ствуют три значения потенциала. Промежуточное значение относится к неустойчивому состоянию, крайние — к устойчивому, т. е. такая система является триггерной (см. § 1, 2 гл. II).

В том случае, когда в рассматриваемой модели перепад давлений поддерживается на постоянном уровне, с помощью импульсов тока можно переводить систему из одного устойчивого состояния в другое (рис. XXIII.23).

В условиях, когда разность давлений не зафиксирована, изменения потенциала на мембране, вызываемые импульсами тока, имеют выраженное

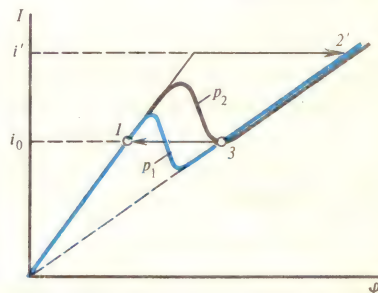


Рис. XXIII.24. Вольт-амперные характеристики мембранной системы при двух перепадах давления (p_1 и p_2) на мембране (остальные обозначения те же, что на рис. XXIII.23)

Предположим, что вначале система находится в стационарном состоянии 1, в котором поддерживаются ток i_0 и давление p_1 . Если подействовать на систему электрическим стимулом, изменив ток до значения i' , то система перейдет в новое устойчивое состояние 2 при давлении p_1 , поскольку на левой ветви нет стационарного состояния, отвечающего давлению p_1 и току i' . По окончании раздражения, когда ток возвращается от i' до i_0 , система перейдет в состояние 3. Если давление в системе не фиксировано, то оно постепенно изменяется и соответственно меняется положение падающего участка вольт-амперной кривой. Когда давление достигает значения p_2 , система не может более оставаться в состоянии, описываемом правой ветвью N-образной вольт-амперной кривой, и переходит в первоначальное состояние 1

сходство с потенциалом действия в аксоне. Амплитуда потенциала действия в модельной системе составляет около 2 В, а продолжительность достигает нескольких минут. Как следует из уравнения (XXIII.7.1), изменение перепада давления на мембране не оказывает влияния на крутизну устойчивых участков вольт-амперной кривой, а влияет только на значение потенциала ϕ^* , при котором происходит изменение направления движения жидкости, т. е. на положение вертикального участка вольт-амперной характеристики. На рис. XXIII.24 приведены стационарные вольт-амперные характеристики системы для двух разных перепадов давления.

Электрохимическая модель, предложенная Теореллом, способна воспроизводить многие свойства нервного волокна, включая проведение возбуждения.

Идеи Т. Теорелла о существовании в мембранах двух устойчивых состояний и о переходах между ними в результате толчков тока или постепенно накапливающихся изменений в системе послужили теоретической основой для гипотезы о механизме нервного возбуждения, выдвинутой И. Тасаки. Отрицая существование специализированных ионных каналов, Тасаки полагает, что возникновение и развитие потенциала действия обусловлено фазовым переходом в мембране и изменением ее ионообменных свойств под действием импульсов тока, ионов К или других раздражителей.

§ 8. Математические модели возбудимых мембран

Математическая модель Ходжкина — Хаксли (см. §§ 2, 3 гл. XXIII) является одним из наиболее точных описаний процесса электрического возбуждения в мембране. Однако эта модель слишком сложна для качественного анализа.

Один из подходов к упрощению этой модели состоит в разделении быстрых и медленных переменных (см. § 3 гл. II). Действительно, переменная Na^+ -активации m изменяется на порядок быстрее, чем переменные n и h . Постоянная времени τ_m составляет $\sim 10^{-4}$ с, а τ_n и $\tau_h \sim 2 \cdot 10^{-3}$ с. Поэтому основное изменение параметров n и h происходит при установившемся значении m ($m = m_\infty$).

Рассмотрим, как упрощаются уравнения Ходжкина — Хаксли при замене переменной m на ее стационарное значение m_∞ . Учтем также экспериментально установленный факт, что значения n и h связаны между собой соотношением

$$h + n = G = \text{const} \quad (\approx 0,85). \quad (\text{XXIII.8.1})$$

С учетом (XXIII.2.2), (XXIII.2.3), (XXIII.3.3) и (XXIII.3.8) полное уравнение Ходжкина — Хаксли записывается в виде

$$Cd\varphi/dt = -[g_{Na}m^3h(\varphi - \varphi_{Na}) + g_Kn^4(\varphi - \varphi_K) + g_l(\varphi - \varphi_l)] + I_{\text{общ}}, \quad (\text{XXIII.8.2})$$

где m , n и h — функции потенциала и времени. Левая часть этого равенства представляет собой емкостный ток, а правая — разность между полным током ($I_{\text{общ}}$), текущим во внешней цепи, и ионным током, складывающимся из трансмембранного тока Na^+ K^+ и тока утечки $[g_l(\varphi - \varphi_l)]$.

Заменив переменную m на ее стационарное значение и выразив h через n из соотношения (XXIII.8.1), получим

$$Cd\varphi/dt = -[g_{Na}m_\infty^3(G - n)(\varphi - \varphi_{Na}) + g_Kn^4(\varphi - \varphi_K) + g_l(\varphi - \varphi_l)] + I_{\text{общ}}. \quad (\text{XXIII.8.3})$$

Поведение переменной n во времени описывается экспонентой (см. § 3, 5 гл. XXIII).

$$dn/dt = (n_\infty - n)/\tau. \quad (\text{XXIII.8.4})$$

Полученная редуцированная система уравнений (XXIII.8.3) и (XXIII.8.4) содержит только две переменные (n и φ) вместо четырех в исходной системе (XXIII.8.2). Числовые расчеты показали, что упрощенная система достаточно хорошо описывает форму потенциала действия; отмечается совпадение и других электрофизиологических характеристик редуцированной модели и полной модели Ходжкина — Хаксли (с точностью 10—15%).

Для оценки свойств решений упрощенной системы строят графики главных изоклин уравнений (XXIII.8.3) и (XXIII.8.4), т. е. изоклины $d\varphi/dt = 0$ и $dn/dt = 0$. Из уравнения (XXIII.8.4) следует, что изоклина $dn/dt = 0$ описывается соотношением

$$n = n_\infty, \quad (\text{XXIII.8.5})$$

где n_∞ — функция потенциала φ (см. рис. XXIII.11).

Изоклину $d\varphi/dt = 0$ находят из уравнения (XXIII.8.3):

$$g_Kn^4(\varphi - \varphi_K) + g_{Na}m_\infty^3(G - n)(\varphi - \varphi_{Na}) + g_l(\varphi - \varphi_l) - I_{\text{общ}} = 0. \quad (\text{XXIII.8.6})$$

Рассчитанные на ЭВМ нуль-изоклины приведены на рис. XXIII.25. Изоклина $d\varphi/dt = 0$ имеет N-образную форму, что обеспечивает генерацию импульса. Особая точка расположена на левой ветви изоклины $d\varphi/dt = 0$ и устойчива. Это соответствует отсутствию спонтанной активности в исходных уравнениях Ходжкина — Хаксли.

Изоклины $dn/dt=0$ и $d\varphi/dt=0$ представляют собой фазовый портрет редуцированной математической модели. На основе фазовых портретов упрощенной модели Ходжкина—Хаксли удается объяснить самые различные электрофизиологические явления.

Спонтанная активность. Известно, что в клетках, не обладающих спонтанной активностью, последняя может быть вызвана увеличением Na^+ - или уменьшением K^+ -проводимости. Однако при этом рассматриваемая модель позволяет определить, когда в системе реализуются автоколебания.

Спонтанная активность в модели возникает, когда система теряет устойчивость, в ней появляется предельный цикл и возникают автоколебания (см. § 2 гл. II). Особые точки, расположенные на средней ветви изоклины $d\varphi/dt=0$, неустойчивы, а расположенные на левой или правой ветви — устойчивы, причем одна из переменных φ оказывается более быстрой, чем n ($\tau_\varphi/\tau_n \sim 10^{-1}$).

Изоклины системы при параметрах, соответствующих мембране аксона, показаны на рис. XXIII.25. Особая точка устойчива (расположена на левой ветви), и мембрана не обладает спонтанной активностью. Уровень потенциала покоя принят условно за нуль. При изменении параметров изоклины деформируются. Если при этом особая точка станет неустойчивой (сместится с левой ветви изоклины $d\varphi/dt=0$ на среднюю), то возникнет спонтанная активность (рис. XXIII.26, I). Если устойчивая точка перемещается на правую ветвь изоклины $d\varphi/dt=0$, то возникает устойчивая деполяризация мембраны (рис. XXIII.26, II).

В гигантском аксоне кальмара и других мембранах автоколебания могут возникать под действием внешнего тока. Рассматривая семейство главных

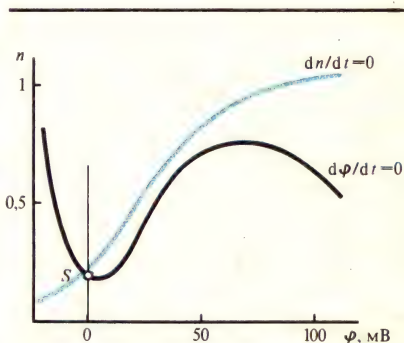
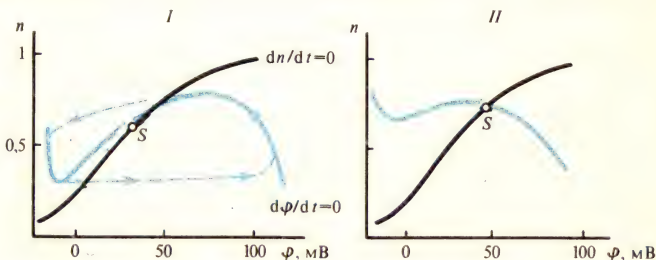


Рис. XXIII.25. Главные изоклины упрощенной модели Ходжкина — Хаксли:

S — стационарная точка лежит на левой ветви; устойчива; n — параметр активации K^+ -проводимости

Рис. XXIII.26. Главные изоклины, соответствующие различным состояниям мембраны:

I — спонтанная активность (особая точка S неустойчива, лежит на средней ветви); пунктиром показана проекция предельного цикла системы на плоскость; II — устойчивая деполяризация мембраны (особая точка S устойчива, расположена на правой ветви); n — параметр активации K^+ -проводимости



изоклин, рассчитанных для разных значений тока, можно определить, в каких условиях (т. е. при каких значениях токов) возникают повторные потенциалы действия. Внешний ток входит только в выражение для изоклины $d\varphi/dt=0$ и поэтому при увеличении тока изменяется лишь ее характер (рис. XXIII.27). Повторные ответы возникают, когда особая точка, смещаясь с левой ветви изоклины $d\varphi/dt=0$ на среднюю, становится неустойчивой. При дальнейшем увеличении тока особая точка смещается со средней ветви на правую и вновь

становится устойчивой. Повторные ответы прекращаются, и возникает устойчивая деполяризация под током.

Скачкообразная деполяризация. При плавном повышении концентрации KCl во внешней среде потенциал покоя возбудимых мембран, может изменяться скачком. Долгое время считали, что классическая теория Ходжкина — Хаксли не объясняет скачкообразную деполяризацию (И. Тасаки). Однако

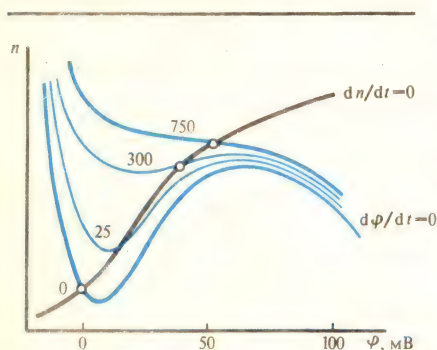


Рис. XXIII.27. Главные изоклины упрощенной модели Ходжкина — Хаксли при изменении внешнего тока (цифры на кривых показаны значения тока в мкА/см²; остальные обозначения те же, что на рис. XXIII.26)

фазовый портрет редуцированной системы позволяет подобрать параметры, при которых этот эффект воспроизводится и на полной модели Ходжкина — Хаксли. Для наблюдения скачкообразной деполяризации необходимо, чтобы при изменении параметра ϕ_K в уравнении (XXIII.8.6) особая точка, определяющая потенциал покоя, скачком переходила с левой ветви изоклины $d\phi/dt=0$ на правую, минуя неустойчивую ветвь (рис. XXIII.28).

Триггерные свойства мембраны. Аксон кальмара при некоторых экспериментальных условиях, например при внутриклеточной перфузии раствором CsF, может вести себя как триггер с двумя устойчивыми состояниями: раздражение током, направленным попеременно наружу и внутрь, приводит к перебросу потенциала из одного устойчивого состояния в другое (рис.

XXIII.29). Однако и здесь можно найти параметры в редуцированной модели, при которых этот необычный эффект воспроизводится в модели Ходжкина — Хаксли. Как видно из рис. XXIII.29, для возникновения триггерных свойств необходимо существование двух устойчивых состояний: нормально поляризованного и деполяризованного. Толчки тока противоположной полярности вызывают в этом случае переходы из одного стабильного состояния в другое.

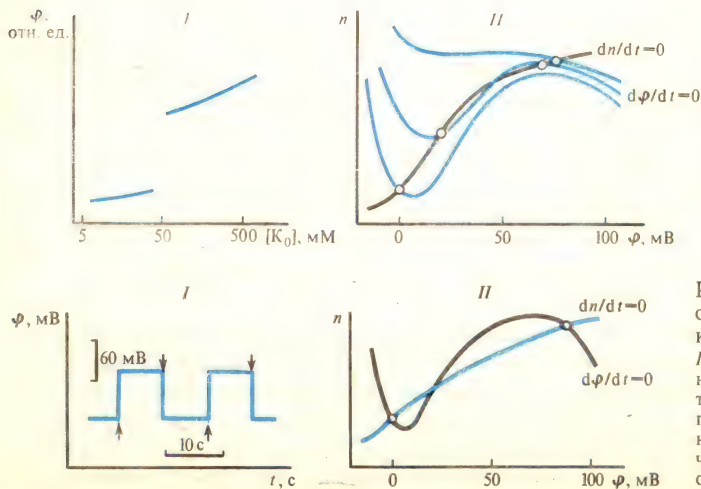


Рис. XXIII.28. Скачкообразная деполяризация в модели при увеличении внеклеточной концентрации K⁺:

I — зависимость потенциала покоя; II — нуль изоклины; точки пересечения соответствуют стационарным состояниям; обозначения те же, что на рис. XXIII.26

Рис. XXIII.29. Триггерные свойства в упрощенной модели Ходжкина — Хаксли:

I — изменения потенциала, вызванные кратковременными толчками тока (показаны стрелками); II — главные изоклины при тех же значениях параметров; точками обозначены два устойчивых стационарных состояния

Таким образом, с помощью качественных методов удастся определить основные характеристики математических моделей мембраны и проанализировать их поведение при различных изменениях параметров.

§ 9. Распространение импульса

Важнейшим свойством нервного импульса является его способность распространяться вдоль волокна без затухания с постоянной скоростью. Распро-

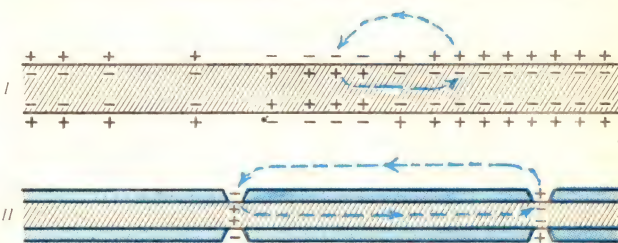


Рис. XXIII.30. Иллюстрация теории локальных токов (по А. Ходжкину, 1965):
I — немиелинизированное нервное волокно, II — миелинизированное нервное волокно

странение возбуждения связано с протеканием локальных токов между покоящимися и активными (возбужденные) участками (рис. XXIII.30). Для простоты рассуждений примем, что внешняя поверхность аксона эквипотенциальна, т. е. внешняя среда хорошо проводит электрический ток. В области возникновения потенциала действия внутренняя часть волокна заряжена положительно, а в соседних невозбужденных участках — отрицательно. В результате возникает локальный ток между возбужденным и покоящимся участками нерва, который деполяризует мембрану непосредственно перед активным участком. При достижении критической деполяризации эта область также возбуждается. Подобным образом возбуждение передается дальше. Одностороннее проведение импульса по нервному волокну связано с тем, что участки, в которых потенциал действия завершен, теряют на некоторое время способность к возбуждению (рефрактерность).

В волокнах позвоночных большая часть поверхности покрыта миелином, который действует как изолятор, поэтому локальный ток проходит между перехватами Ранвье (рис. XXIII.30, II). В результате возбуждение передается скачками от одного перехвата Ранвье к другому, причем с большей скоростью и с меньшими затратами энергии, чем в немиелинизированных волокнах сравнимого диаметра. Малые энергетические потери объясняются тем, что электрическая емкость миелиновой оболочки очень мала и на ее зарядку требуется значительно меньше энергии, чем на зарядку мембраны аксона беспозвоночных, имеющей высокую электрическую емкость. В дальнейшем будет рассмотрен лишь процесс передачи импульсов по немиелинизированным (безмякотные) волокнам.

Волокна, по которым распространяется нервный импульс, обычно сравнивают с кабелем, имеющим несовершенные электрические свойства (низкая электропроводность аксоплазмы, недостаточные изолирующие свойства мембраны, большая мембранная емкость). Эквивалентная электрическая схема аксона, отражающая его кабельные свойства, представлена на рис. XXIII.31. В случае аксона, погруженного в большой объем проводящей среды, наружным сопротивлением можно пренебречь и наружный потенциал считать постоянным. Внутреннее сопротивление на единицу длины обозначим r_i (Ом/см), а сопротивление мембраны на единицу длины — r_m (Ом·см). Пусть в одной точке аксо-

на приложена разность потенциалов φ_0 по отношению к уровню потенциала покоя. Распределение потенциала вдоль аксона в условиях, когда мембрана не возбуждена, определяется силой продольного тока в аксоплазме. Согласно закону Ома, продольный ток (i_l) пропорционален проводимости участка аксоплазмы и падению напряжения на данном участке:

$$i_l = -(1/r_i) d\varphi/dx. \quad (\text{XXIII.9.1})$$

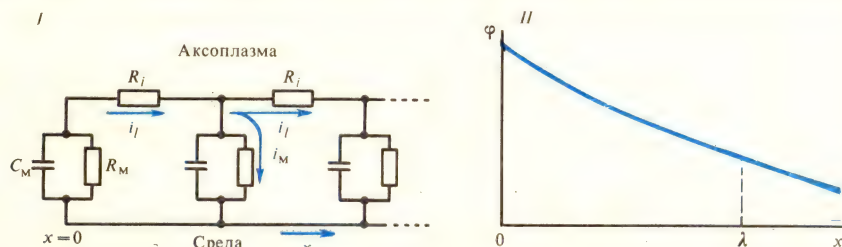


Рис. XXIII.31. Эквивалентная электрическая схема волокна, отражающая его кабельные свойства (I) и распределение потенциала по длине волокна (x) при «инъекции» тока в точке $x=0$ (II):

λ —постоянная длины волокна, C_m —емкость мембраны, R_m —сопротивление мембраны, R_i —сопротивление аксоплазмы, i_l —продольный ток, i_m —мембранный ток

С увеличением расстояния x продольный ток уменьшается из-за утечки в наружную среду; эта часть составляет мембранный ток. Так как ток через мембрану i_m равен убыли продольного тока на участке dx , можно записать

$$i_m = -di_l/dx = (1/r_i) d^2\varphi/dx^2. \quad (\text{XXIII.9.2})$$

С другой стороны, по закону Ома, мембранный ток равен $i_m = \varphi/r_m$, где φ — разность потенциалов на удалении x от точки приложения потенциала φ_0 . В итоге получим

$$(r_m/r_i) d^2\varphi/dx^2 = \varphi \quad (\text{XXIII.9.3})$$

или $\lambda^2 d^2\varphi/dx^2 = \varphi$, где $\lambda^2 = r_m/r_i$.

Решение уравнения (XXIII.9.3) имеет вид

$$\varphi = \varphi_0 e^{-x/\lambda}. \quad (\text{XXIII.9.4})$$

Сигнал экспоненциально затухает с увеличением расстояния, ослабляясь до φ_0/e при $x=\lambda$. Величина $\lambda = \sqrt{r_m/r_i}$ называется постоянной длины волокна. Зависимость r_m и r_i от удельных сопротивлений 1 см^2 мембраны (R_m) и 1 см^3 аксоплазмы (R_i) выражается следующим образом:

$$r_m = R_m/(\pi D); \quad r_i = 4R_i/(\pi D^2), \quad (\text{XXIII.9.5})$$

где D — диаметр волокна. Следовательно, константа длины пассивного волокна равна $[DR_m/(4R_i)]^{1/2}$, т. е. пропорциональна корню квадратному из толщины волокна. У безмякотного аксона диаметром 30 мкм с $R_m = 5 \text{ кОм} \cdot \text{см}^2$ и $R_i = 50 \text{ Ом} \cdot \text{см}^3$ константа длины равна 2,7 мм. У клеток харовых водорослей, достигающих в диаметре 1 мм, при сопротивлении $R_m = 10 \text{ кОм} \cdot \text{см}^2$ постоянная длины составляет несколько сантиметров. При возбуждении R_m резко снижается и соответственно уменьшается константа длины.

Хотя кабельные свойства аксона несовершенны, непрерывная кабельная связь между соседними участками волокна — необходимый фактор в процессе передачи электрических изменений от одной точки к другой. Отсутствие затухания при распространении импульса объясняется тем, что аксон не обычный кабель: вдоль его волокна в мембране размещены молекулярные «генераторы», подпитывающие бегущий импульс.

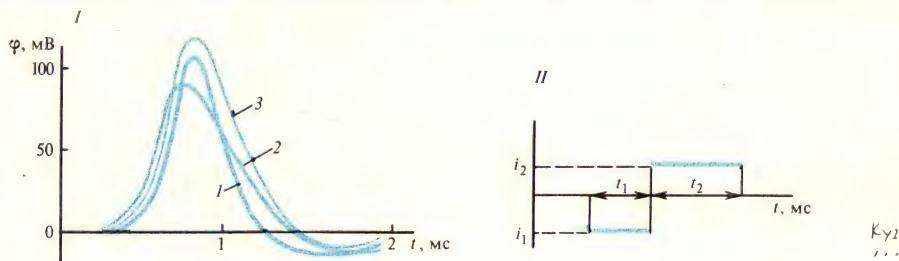


Рис. XXIII.32. Распространяющийся импульс. I—форма импульса; II—аппроксимация ионного тока при возбуждении (импульс, направленный вниз, соответствует входящему Na^+ -току. Импульс, направленный вверх, соответствует выходящему K^+ -току):

1—аксон кальмара при $18,5^\circ\text{C}$; 2—числовое решение системы уравнений Ходжкина—Хаксли, 3—форма импульса при аппроксимации ионного тока двумя ступенями; t_1 , t_2 —продолжительность входящего и выходящего тока, i_1 , i_2 —амплитуды входящего и выходящего тока

Распределение мембранного потенциала по волокну $\varphi(x, t)$ в общем случае определяется кабельным уравнением, которое вытекает из условия равенства полного тока через мембрану i_m [см. (XXIII.9.2)] сумме емкостного и ионного токов [см. (XXIII. 2.2)]:

$$\frac{1}{r_i} \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} = I + C \frac{\partial \varphi}{\partial t}, \quad (\text{XXIII.9.6})$$

где C — емкость мембраны, приходящаяся на единицу длины волокна, r_i — сопротивление аксоплазмы на единицу длины, I — ионный ток, протекающий через мембрану; значение потенциала φ отсчитывается от уровня потенциала покоя. Ток I складывается из парциальных ионных токов: натриевого, калиевого и тока утечки (см. § 2 гл. XXIII). Динамика изменения каждого из парциальных токов описывается эмпирическим уравнением Ходжкина — Хаксли.

Таким образом, задача об отыскании скорости распространения импульса и его формы сводится к решению уравнения (XXIII.9.6) в системе с уравнениями Ходжкина — Хаксли. В результате числовых решений с помощью ЭВМ удается рассчитать форму и скорость распространения потенциала действия (рис. XXIII.32).

Задача о распространении нервного возбуждения по волокну существенно упрощается, если ионный ток, входящий в соотношение (XXIII.9.6), описывать не системой уравнений Ходжкина — Хаксли, а аппроксимировать его двумя ступенями разной направленности. Иными словами, предполагают, что в некоторый момент, соответствующий началу возбуждения, включается ток, направленный внутрь волокна и равный по модулю i_1 . Спустя время t_1 ток меняется на противоположный и равный i_2 . Эта фаза продолжается в течение времени t_2 (рис. XXIII.32, II). Физически это означает, что в мембране существует генератор тока, обладающий пороговыми свойствами. Дополнительное

условие состоит в том, что заряд, протекающий при возбуждении в одном направлении, равен заряду, протекающему в другом направлении: $i_1 t_1 = i_2 t_2$.

Введение упрощающих допущений о постоянстве значения ионного тока на временных интервалах, соответствующих переносу ионов через Na^+ - и K^+ -каналы, позволяет найти решение уравнения (XXIII.9.6) в явном виде. Поскольку скорость бегущей волны первоначально неизвестна, для решения (XXIII.9.6) удобно ввести новую (так называемая автомодельная) переменную

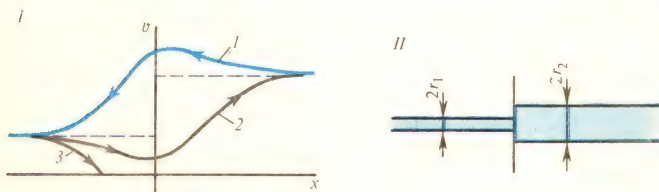


Рис. XXIII.33. Прохождение импульса по расширенному волокну. I — изменение скорости импульса (v) в зависимости от его направления; II — схема расширяющегося волокна: 1, 2 — импульсы проходят, 3 — импульсы блокируются; штриховая линия показывает скорость распространения импульса вдали от места изменения диаметра волокна

$\xi = x - vt$, где v — скорость распространения импульса. Если перемещать точку наблюдения x по волокну со скоростью распространения импульса, то значение аргумента ξ и соответственно потенциала $\varphi(\xi)$ не меняется. Иначе говоря, в координатах ξ , $\varphi(\xi)$ распространяющийся импульс оказывается как бы остановленным (ср. § 4 гл. II).

После введения переменной ξ уравнение (XXIII.9.6) преобразуется к виду

$$\frac{\partial^2 \varphi}{\partial \xi^2} + v r_i C \frac{\partial \varphi}{\partial \xi} - r_i i(\xi) = 0, \quad (\text{XXIII.9.7})$$

т. е. сводится к линейному уравнению второго порядка. Начало координат выбирают в той точке, где начинается возбуждение мембраны, т. е. $\varphi(0) = \varphi^*$, где φ^* — пороговый потенциал. При подборе параметров $i_1 = 63 \text{ мкА/см}^2$, $i_2 = 40 \text{ мкА/см}^2$, $t_1 = 0,35 \text{ мс}$ и $t_2 = 0,55 \text{ мс}$ удастся получить хорошее соответствие между расчетной формой импульса и формой потенциала действия, наблюдаемой в эксперименте (рис. XXIII.32, I). Решение показывает, что существует два допустимых значения скорости, каждому из которых соответствует бегущий импульс определенной формы, причем один оказывается устойчивым, а другой — неустойчивым.

Скорость устойчивого импульса описывается простой формулой, если пренебречь проводимостью мембраны в состоянии покоя:

$$v_1 = [i_1 / (\varphi^* r_i C^2)]^{1/2}. \quad (\text{XXIII.9.8})$$

В выражение входят только параметры первой фазы тока возбуждения, т. е. скорость распространения определяется передним фронтом бегущего импульса.

Изучение зависимости скорости распространения импульса от диаметра нервного волокна в экспериментах на безмякотных волокнах показало, что скорость приблизительно пропорциональна квадратному корню из диаметра волокна. Такой же результат дает и приведенная формула. Для гигантского волокна кальмара получается скорость около 21 м/с.

На основе модели порогового мембранного генератора ионного тока можно изучать распространение импульсов по неоднородным и ветвящимся волокнам, а также рассмотреть взаимодействие импульсов в параллельных волокнах. Так, анализ прохождения импульса по расширяющемуся волокну (рис.

XXIII.33) показывает, что по мере приближения к месту расширения скорость импульса уменьшается, а после расширения начинает расти, пока не достигнет нового стационарного значения, которое превышает первоначальное. Таким образом, переход к более высоким значениям скорости происходит не монотонно, а с периодом замедления, который тем больше, чем больше разница в сечениях волокна. При достаточно большом расширении импульс может остановиться совсем. Расчет, сделанный в описанной выше модели, показывает, что при критическом расширении волокна, которое уже не пропускает импульс, условие блокирования имеет вид

$$(r_2/r_1)^{3/2} > \kappa + 1,11 \kappa^{1/2} - 1,69 = K(\kappa), \quad (\text{XXIII.9.9})$$

где r_1 и r_2 — радиусы двух частей волокна, κ — фактор безопасности, равный отношению амплитуды потенциала действия к порогу возбуждения. Для гигантского аксона кальмара оценки показывают, что критическим является расширение, несколько больше четырехкратного.

При обратном движении импульса блокирования не происходит. Импульс всегда может перейти из широкого волокна в узкое. Но изменение скорости при прохождении неоднородности носит противоположный характер. При подходе к сужению скорость импульса увеличивается, а затем начинает спадать до нового стационарного значения. Таким образом, на графике скорости наблюдается своеобразная петля гистерезиса, происхождение которого физически вполне понятно. Расположенное впереди широкое волокно с большой емкостью представляет собой мощный сток для заряда, поэтому значение потенциала медленнее поднимается до порогового. Наоборот, в суженной части не может поглотиться большой заряд, и эта часть волокна представляет собой отражающий экран, вблизи которого потенциал увеличивается скорее, а следовательно, скорость распространения импульса увеличивается.

Другим видом неоднородности является ветвление волокон, где возможны различные способы прохождения и блокирования импульса. Если импульс подходит к узлу ветвления по одному волокну (рис. XXIII.34), то условие блокирования имеет вид

$$(r_2^{3/2} + r_3^{3/2})/r_1^{3/2} > K(\kappa). \quad (\text{XXIII.9.10})$$

Если импульсы подходят к узлу ветвления сразу по двум волокнам, то условие блокирования при синхронном движении импульсов имеет вид

$$r_3^{3/2}/(r_1^{3/2} + r_2^{3/2}) > K(\kappa). \quad (\text{XXIII.9.11})$$

При одновременном подходе импульсов к узлу ветвления условие блокирования зависит от временного сдвига Θ между ними. Если временной сдвиг между импульсами мал, то импульсы «помогают» друг другу проникнуть в широкое третье волокно. Однако если сдвиг достаточно велик, то импульсы начинают мешать друг другу, поскольку импульс, подошедший первым, но не сумевший возбудить третье волокно, частично переводит узел в рефрактерное состояние.

В организме нервные волокна обычно объединены в пучки или нервные стволы, где каждое волокно представляет собой самостоятельную линию связи. Однако, когда по одному из волокон движется нервный импульс, он создает электрическое поле в окружающей межклеточной жидкости, которое может повлиять на мембранный потенциал соседних волокон. Действительно, при обработке нервных стволов специальными химическими веществами удается

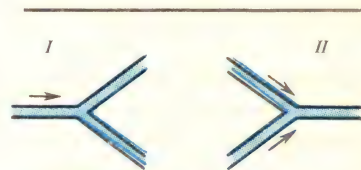


Рис. XXIII.34. Прохождение импульсов через узел ветвления. I — импульс подходит по одному волокну; II — импульс подходит сразу по двум волокнам

наблюдать не только взаимные помехи, но и передачу возбуждения между соседними волокнами.

Исследование одновременного прохождения импульсов по разным волокнам показало, что взаимодействие импульсов может приводить к их синхронизации. В результате при одновременном возбуждении волокон может возникнуть коллективный импульс. Однако синхронизоваться могут лишь импульсы, скорости которых отличаются не более чем на 10%, причем их взаимодействие очень сильно увеличивается с ростом сопротивления внешней среды. При возбуждении одного волокна в соседнем наводится знакопеременный мембранный потенциал: вначале волокно гиперполяризуется (пониженная возбудимость), затем деполяризуется (повышенная возбудимость) и наконец еще раз гиперполяризуется. Непосредственная передача возбуждения на соседнее волокно увеличивается при повышении его радиуса.

Для решения задачи об одновременном возбуждении двух соседних волокон необходимо искать автомодельное решение, когда два импульса движутся с одинаковой скоростью на постоянном расстоянии друг от друга. В этом случае существует два неизвестных параметра: скорость и расстояние между импульсами. Так как импульсы влияют друг на друга, то формально скорость каждого из них является функцией расстояния между ними.

Основные результаты, изложенные выше, были получены с помощью простой модели мембранного генератора тока. В таком подходе остается неясным, как влияет истинная динамика развития возбуждения на распространение импульса. Рассмотрим в связи с этим соотношение (XXIII.9.6), где ток I описывается уравнениями Ходжкина — Хаксли. Для вычисления скорости импульса можно учитывать лишь процессы, протекающие в области его фронта. Напомним, что переменные m , n и h характеризуются существенными различиями в скоростях их изменений, а именно

$$\tau_m \ll \tau_n \sim \tau_h, \quad (\text{XXIII.9.12})$$

где τ_n , τ_h , τ_m — характерные времена релаксации переменных: K^+ -проводимости, инактивации и активации Na^+ -проводимости соответственно. Пользуясь указанной иерархией времен (XXIII.9.12) и учитывая лишь переменную m , можно упростить систему (XXIII.9.6) и уравнения Ходжкина — Хаксли до приближенной системы двух уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d\psi}{d\xi} &= \frac{1}{u^2} \frac{d^2\psi}{d\xi^2} + m^3, -\infty < \xi < \infty; \\ \frac{dm}{d\xi} &= -\frac{1}{\tau(\psi)} [m - m_\infty(\psi)], \end{aligned} \quad (\text{XXIII.9.13})$$

где введены автомодельная координата $\xi = t + x/v$ и следующие обозначения: $u = v(RC^2\varphi^*/i)^{1/2}$, $\psi = \varphi/\varphi^*$. Здесь $\tau(\psi)$ и $m_\infty(\psi)$ — известные функции. В случае быстрой релаксации Na^+ -переменной m скорость распространения возбуждения имеет вид

$$u = 1, \text{ т.е. } v = [i/(RC^2\varphi^*)]^{1/2} \quad (\text{при } \tau \rightarrow 0). \quad (\text{XXIII.9.14})$$

Этот результат совпадает с выражением (XXIII.9.8) для скорости распространения импульса в модели мембранного генератора, рассмотренной выше. Очевидно, эта модель отвечает случаю быстрой релаксации Na^+ -тока. В другом предельном случае — медленной релаксации — получаем выражение

$$v \simeq 1,25 [i/(\tau^3 C^5 \varphi^* R^4)]^{1/8}. \quad (\text{XXIII.9.15})$$

Сопоставление с экспериментом показывает, что предельный случай медленной релаксации (XXIII.9.15) Na^+ -тока является наилучшим приближением для описания скорости распространения нервного импульса.

VIII

Трансформация энергии в биомембранах



XXIV

Перенос электронов
и трансформация энергии
в биомембранах

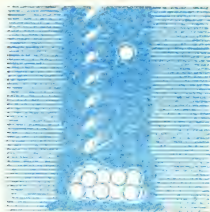
XXV

Биофизика сократительных систем

XXVI

Биофизика процессов рецепции

Перенос электронов и трансформация энергии в биомембранах



§ 1. Общая характеристика преобразования энергии в биомембранах

В течение последних 15—20 лет стало ясно, что процессы трансформации энергии при электронном транспорте в мембранах некоторых бактерий, митохондрий, хлоропластов и хроматофоров обладают фундаментальным сходством. Во всех этих системах происходит использование энергии электронного потока для синтеза молекул АТФ. Механизмы этого процесса, однако, во многом непонятны. Согласно хемиосмотической гипотезе Митчела, перенос электронов по электрон-транспортной цепи приводит к переносу протонов через гидрофобный барьер мембраны. Сформулированный в общей форме хемиосмотический принцип сопряжения Митчела предполагает, что перенос электронов связан с синтезом АТФ через образование трансмембранной разности электрохимических потенциалов [см. (V.3.12)] ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}^+$):

$$\Delta\mu\text{H}^+ = F\Delta\phi + 2,3RT\Delta p\text{H}, \quad (\text{XXIV.1.1})$$

где $\Delta\phi$ — разность электрических потенциалов, $\Delta p\text{H}$ — разность концентраций водородных ионов по обе стороны мембраны, F — число Фарадея, R — газовая постоянная, T — температура. Считают, что энергия $\Delta\mu\text{H}^+$ используется для синтеза АТФ из АДФ и P_i с помощью особого фермента — мембранной АТФ-синтетазы (H^+ -АТФаза). Однако молекулярные механизмы, посредством которых при переносе электронов происходит трансмембранный перенос протонов, а также механизм образования АТФ с помощью АТФазы остаются предметом дискуссий.

§ 2. Электронно-транспортные цепи

В митохондриях образование доноров электронов (НАДН, сукцинат и др.) для ЭТЦ дает начало переносу электронов во внутренней мембране от НАДН и сукцината к кислороду, сопряженному с транслокацией протонов.

Известно около 20 переносчиков электронов, составляющих ЭТЦ митохондрий; это основные элементы структуры митохондрий, на которые приходится около 25% белка митохондриальных мембран. Среди переносчиков только НАД, флавины и убинон являются двухэлектронными, в то время как остальные компоненты ЭТЦ — одноэлектронные.

Белковые компоненты переносчиков влияют на окислительно-восстановительные превращения переходных металлов, входящих в их состав, а также создают специфическое, диэлектрическое и химическое окружение при переносе электронов (ср. § 4 гл. XIV).

Как правило, в ЭТЦ переносчики электронов расположены в последова-

тельности, при которой их среднеточечные окислительно-восстановительные потенциалы ($E_{1/2}$) возрастают от отрицательных значений, приблизительно соответствующих водородному электроду, до значения, приближающегося к потенциалу, при котором происходит восстановление O_2 до H_2O . Окисление НАДН ($E_{1/2} = -320$ мВ) молекулярным кислородом влечет за собой общее изменение потенциала приблизительно на 1,1–1,2 В. Эта разность окислительно-восстановительных потенциалов, включающая ряд более мелких перепадов, и есть та движущая сила, которая в обычных условиях приводит к синтезу АТФ. Переносчики электронов расположены асимметрично в мембране, что приводит к зависимости кажущихся среднеточечных окислительно-восстановительных потенциалов отдельных переносчиков от значений трансмембранного и поверхностного потенциалов.

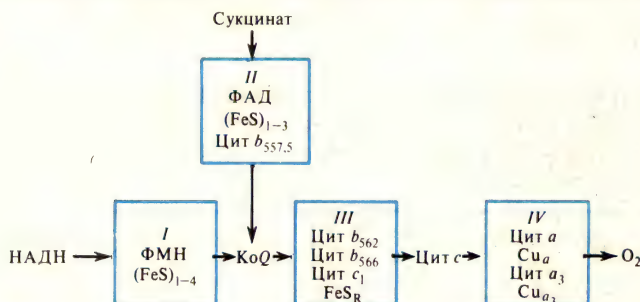


Рис. XXIV.1. Мультимерные комплексы, составляющие дыхательную цепь митохондрий

Фракционирование препаратов внутренней мембраны митохондрий из сердца быка привело к разделению митохондриальной электрон-транспортной системы на четыре белково-липидных комплекса:

I. НАДН: убихинон-оксидоредуктаза.

II. Сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза.

III. Убихинол: феррицитохром *c*-оксидоредуктаза.

IV. Цитохром *c*: кислород-оксидоредуктаза.

Полная ЭТЦ состоит из четырех отдельных мультимерных комплексов (рис. XXIV.1), которые принято обозначать цифрами I, II, III, IV. Некоторые

Таблица XXIV.1. Свойства комплексов цепи переноса электронов митохондрий (по I. Hatefi, I. M. Galante, 1978)

Комплекс	Соотношение в мембране	Молекулярная масса комплекса	Количество полипептидов в комплексе	Компоненты комплексов	Молекулярное соотношение компонентов в комплексе	Специфические ингибиторы
I. НАДН: КоQ-оксидоредуктаза	1	< 700	16—18	ФМН Негемовое железо Убихинон	1 16—18 4	Ротенон Амита Пирицидин
II. Сукцинат: КоQ-оксидоредуктаза	2	200	4	ФАД Негемовое железо Цитохром <i>b</i>	1 7—8 1	α -Теноил-трифторацетон

Продолжение табл. XXIV. 1

Комплекс	Соотношение в мембране	Молекулярная масса комплекса	Количество полипептидов в комплексе	Компоненты комплексов	Молекулярное соотношение компонентов в комплексе	Специфические ингибиторы
III. CoQH_2 : цитром <i>c</i> -оксидоредуктаза	3	250	8—9	Цитохром <i>b</i> Цитохром <i>c</i> ₁ Негемовое железо Убихинон	2 1 2 ≥ 1	Антимицин А
IV. Цитохром <i>c</i> : O_2 -оксидоредуктаза	7	150—200	7	Цитохром <i>a</i> Цитохром <i>a</i> ₃ Медь	1 1 2	Цианид Азид СО

свойства этих комплексов приведены в табл. XXIV.1. Каждый комплекс состоит, как правило, не менее чем из пяти субъединиц; часть из них несет на себе кофакторы, между которыми возможен перенос электронов. Комплексы входят в ЭТЦ в различных соотношениях.

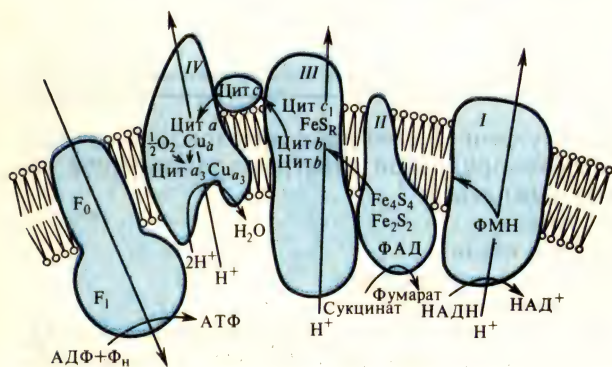


Рис. XXIV.2. Электрон-транспортная цепь дыхания и сопрягающий комплекс во внутренней мембране митохондрий:

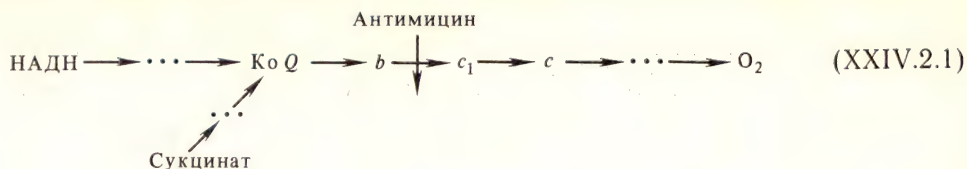
I—IV—электрон-транспортные комплексы, F_0 , F_1 —сопрягающий комплекс (H^+ -АТФаза)

Электроны между комплексами переносятся с помощью мобильных переносчиков—убихинона (не показан) и цитохрома (цит) *c*. Двигаясь диффузно через липидный слой мембраны, убихинон связывает между собой комплексы I и III, а также комплексы II и III. Цитохром *c* также выполняет аналогичную «челночную» функцию на участке между комплексами III и IV, диффундируя вдоль поверхности мембраны. Не исключена возможность непосредственного переноса электронов от одного комплекса к другому

На рис. XXIV.2 показана предполагаемая организация электрон-транспортных комплексов I—IV и АТФазы (F_0F_1) во внутренней мембране митохондрий.

Комплекс III занимает центральное место в энергетическом обмене не только в ЭТЦ митохондрий, но и в хлоропластах, хромофорах, а также в некоторых бактериях. Поэтому ниже более детально рассмотрен перенос электронов в этом комплексе.

Наиболее простой является линейная последовательность переноса электронов в дыхательной цепи, в частности в комплексе III:



Эта схема хорошо согласуется с наблюдением, что ингибирование электронного переноса в митохондриях антимицином приводит к увеличению восстановленности убихинона и цитохромов b и уменьшению восстановленности цитохромов c и c_1 . Однако оказалось, что в присутствии сукцината и антимицина А добавка кислорода или феррицианида приводит к восстановлению цитохромов b , в то время как согласно линейной схеме (XXIV.2.1) должно

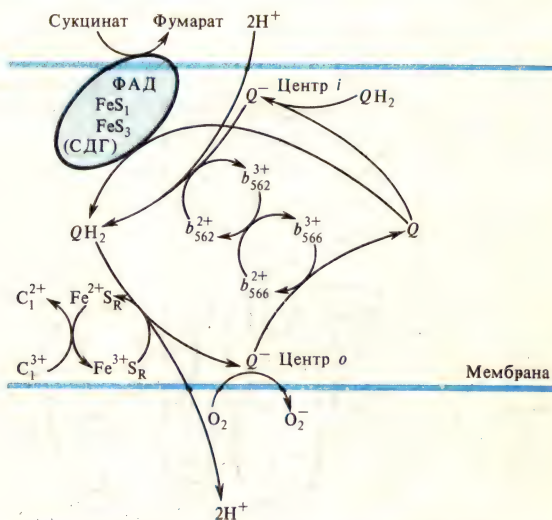


Рис. XXIV.3. Q-цикл Митчела

Предполагают наличие двух мест реакций, в которых участвует убихинон,—так называемые центры i и o , локализованные, по-видимому, на противоположных сторонах мембраны. В центре o убихинол окисляется до убихинона с освобождением двух протонов, причем один электрон от убихинола поступает к железосерному белку Риске, а затем к цитохрому c_1 , в то время как другой поступает к цитохрому b_{566} . Восстановленный семихиноном цитохром b_{566} , в свою очередь, восстанавливает цитохром b_{562} . Электрон от цитохрома b_{562} используется для восстановления убихинона в центре i

было бы наблюдаться его окисление. Существует еще целый ряд кинетических особенностей, которые наряду с эффектом «сверхвосстановления» цитохромов b заставляют отказаться от линейной схемы (XXIV.2.1). П. Митчелом (1975) для объяснения сложного поведения цитохромов b в комплексе III была предложена схема так называемого Q-цикла (рис. XXIV.3).

В отличие от линейной схемы здесь предполагается отсутствие непосредственного окислительно-восстановительного контакта между цитохромами b и c (c_1); их взаимодействие друг с другом осуществляется через убихинон.

Детальное рассмотрение строения фотосинтетической цепи электронного транспорта будет проведено в гл. XXVII. Здесь лишь необходимо отметить, что фотосинтетические ЭТЦ, подобно митохондриальной, построены по блоч-

ному принципу (см. рис. XXIV.2). Для всех этих цепей характерна асимметричная организация переносчиков электронов в мембране, согласованная с ориентацией АТФазы. Сходство простирается также и на АТФазы, которые имеют практически идентичный субъединичный состав. Сравнительный анализ электрон-транспортных комплексов, участвующих в преобразовании энергии, приводит к выводу, что они составляют структурно-функциональную основу электрон-транспортных биоэнергетических процессов. Электрон-транспортные комплексы можно рассматривать как необходимую для этого минимальную функциональную единицу. При этом отдельные подвижные переносчики

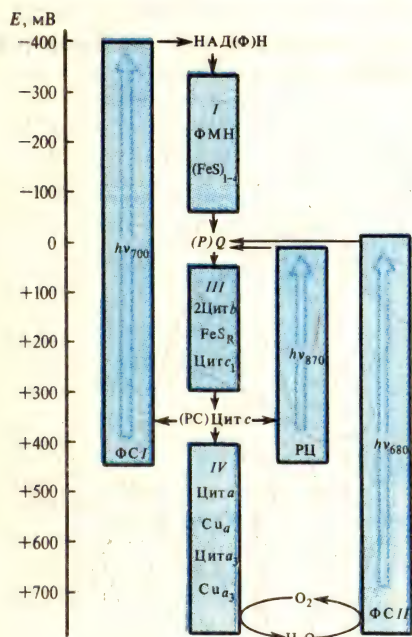


Рис. XXIV.4. Сопряжение различных электрон-транспортных комплексов в ЭТЦ митохондрий, хлоропластов и хроматофоров

Дыхательная цепь митохондрий представлена тремя комплексами (I, III, IV), способными окислять НАДН до воды. Фотосинтетические ЭТЦ представлены соответствующими РЦ. В центре рисунка находится комплекс III, содержащий цитохром типа b, цитохром типа c₁ и железосерный белок Рискс (FeS_R). Донором электронов для него является убинон (Q) или пластохинон (PQ), акцептором — цитохром c (цит c) или пластоцианин (PC). Среди комплексов, способных генерировать ΔμH⁺, комплекс III, по-видимому, является наиболее универсальным, поскольку присутствует в ЭТЦ митохондрий, хлоропластов и хроматофоров. Остальные комплексы молекул переносчиков, участвующие в преобразовании энергии, являются более специфическими и присутствуют лишь у определенных групп организмов

электронов играют подчиненную роль, обеспечивая перенос электрона между комплексами. Очевидно, созданные природой и отобранные в результате эволюции комплексы переносчиков оказались достаточно универсальными, чтобы удовлетворить энергетические потребности различных организмов.

На рис. XXIV.4 приведены в единой энергетической шкале все три энергопреобразующих комплекса митохондрий, а также фотосинтетические РЦ фотосинтезирующих бактерий и хлоропластов.

В ЭТЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий (см. гл. XXVII, XXVIII), поглощающих свет в дальней красной области, энергии кванта света хватает только на то, чтобы для организации потока электронов использовать лишь комплекс III. Использовать цитохром-оксидазу (комплекс IV) им удастся только в аэробных условиях (несерные пурпурные бактерии). Восстановить НАД бактерии могут лишь за счет обратного транспорта электронов, который начинается на уровне хинонов и захватывает комплекс I.

В фотосинтезе высших растений для переноса электронов от фотосистемы II (ФС II) к фотосистеме I (ФС I) может быть использован комплекс III (b₆—f-комплекс). Поэтому представляется естественным сходство акцепторных сторон фотосинтетических реакционных центров (РЦ) бактерий и ФС II зе-

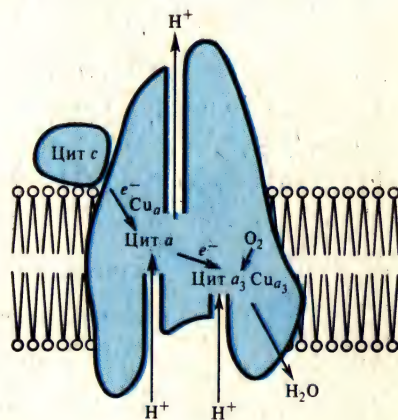
ленных растений, когда в том и другом случаях происходит сопряжение РЦ с комплексом III. Существует также определенное сходство донорной части РЦ пурпурных бактерий и ФС I высших растений в значениях окислительно-восстановительных потенциалов переносчиков, находящихся в донорной стороне РЦ. В обоих случаях происходит сопряжение комплекса III с фотосинтетическими РЦ.

Таким образом, в центре схемы энергетического преобразования стоят комплекс III и, возможно, комплекс I. Сопряжение с этими комплексами всех остальных энергопреобразующих комплексов, специфичное для каждого типа организмов, и образует ЭТЦ.

§ 3. Механизмы транслокации протонов и генерации $\Delta\bar{\mu}H^+$ в дыхательной и фотосинтетической цепях электронного транспорта

Механизмы сопряжения. Асимметрично локализованные комплексы переносчиков функционируют так, что перенос электрона сопровождается транслокацией протона через мембрану. Возможны различные механизмы этого сопря-

Рис. XXIV.5. Цитохромоксидаза как редокс-зависимая протонная помпа



Функция цитохромоксидазы заключается не только в поглощении протонов, необходимых для восстановления кислорода до воды, но и в переносе протонов из внутренней фазы наружу

жения (см. § 4 гл. XXII). Во-первых, предполагают существование асимметрично расположенных специальных мембранных белков, переносящих протон. Их сродство к протону и протонсвязывающие свойства меняются при переносе электрона, что и приводит к соответствующим изменениям концентрации протонов на обеих сторонах мембраны. Во-вторых, возможно образование редокс-зависимого протонного канала в белковой части переносчика электронов. В этом случае переносчик электронов должен одновременно выполнять функции и протонного насоса. Предполагают, что транслокация протонов при окислительно-восстановительных превращениях переносчиков происходит либо за счет конформационных изменений самих переносчиков (или специального протонфорного белка), либо за счет редокс-зависимого протонирования — депротонирования. Пока неясно, каким образом происходит транспорт протонов против поля. Так, в случае цитохромоксидазы предполагают, что наиболее гидрофобная третья субъединица цитохромоксидазы формирует редокс-зависимый протонный канал. Важную роль в транслокации протона, видимо, играют окислительно-восстановительный превращения гема цитохрома *a*. Об этом свидетельствуют чувствительность этого цитохрома к протонам матрикса и зави-

сящий от наличия третьей субъединицы окислительно-восстановительный потенциал цитохрома *a* (рис. XXIV.5).

В-третьих, перенос протона может быть обусловлен работой подвижных переносчиков, которые, восстанавливаясь на одной стороне мембраны, одновременно с электроном присоединяют протон, а затем диффундируют на другую сторону мембраны, где происходит окисление переносчика и выброс протона за счет диссоциации в примембранную область. В соответствии с этим П. Митчелл предположил, что в каждом протонпереносящем сегменте ЭТЦ переносчики водорода ($2\text{H}^+ + 2e^-$) чередуются с переносчиками электронов ($2e^-$) (рис. XXIV.6), образуя редокс-петлю. Согласно схеме редокс-петли, переносчик

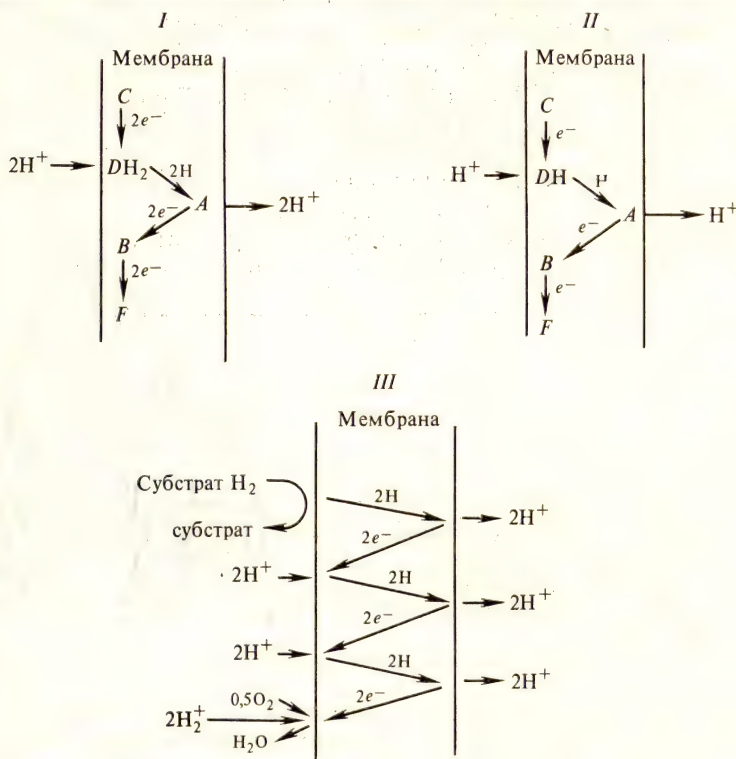


Рис. XXIV.6. Перенос зарядов через мембрану (по П. Митчеллу, 1966):

I, II—отдельная редокс-петля, III—дыхательная цепь митохондрий

водорода *D* передает водород переносчику *A*, находящемуся на противоположной стороне мембраны. При окислении *D* и восстановлении *A* происходит освобождение двух протонов в среду. Электроны от *A* трансмембранно переносятся на другой переносчик электронов *B*. Можно представить, что переносчик водорода, будучи незаряженным, подобно хинону, диффундирует по градиенту концентрации к *A*. В то же время перенос электронов от *A* к *B* происходит против электрического поля, образующегося при трансмембранном переносе протонов. При такой организации электронного транспорта окисление донора электронов *DH* конечным акцептором *B*, находящимся на той же стороне мембраны, сопряжено с трансмембранным переносом протонов и, следовательно, генерирует

на мембране $\Delta\bar{n}H^+$. Перенос двух электронов в редокс-петле сопровождается транслокацией двух протонов.

Три комплекса ЭТЦ в дыхательной цепи I, III и IV играют роль генераторов $\Delta\bar{n}H^+$, сопрягающих перенос электронов с трансмембранным переносом протонов. Действительно, для изолированных комплексов доказана способность генерировать $\Delta\bar{n}H^+$ при встраивании их в липосомы из фосфолипидов. Таким образом, эти комплексы являются не только структурной единицей переноса электронов, но и функциональной единицей сопряжения переноса электронов с образованием АТФ.

Перенос протонов в фотосинтезе. На рис. XXIV.7 изображена схема функционирования фотосинтетической цепи высших растений, где последовательно взаимодействуют две фотосистемы I и II (подробнее см. гл. XXVII—XXVIII). Каждая фотосистема переносит один электрон с внутренней на наружную сторону мембраны тилакоида за время короче 20 нс. Полярность мембраны тилакоида, обратная полярности митохондрий, характеризуется плюсом на внутренней и минусом на наружной стороне мембраны. Взаимосвязь фотосистем осуществляется подвижным переносчиком пластохиноном, который передает электроны и протоны с наружной на внутреннюю сторону мембраны за 20 мс. Как окисление воды, так и окисление пластогидрохинона другими переносчиками, которые сами не связывают протоны при своем восстановлении, освобождает по одному протону во внутреннее пространство тилакоида. Наоборот, при восстановлении пластохинона и НАДФ на наружной стороне

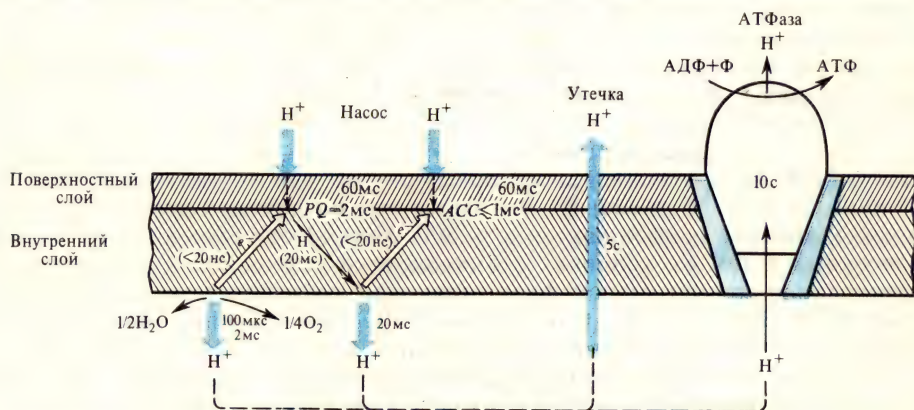


Рис. XXIV.7. Схема трансмембранного переноса протонов в фотосинтетической мембране: АСС—акцепторы; толстыми стрелками показан перенос протона; сопряженный с переносом электрона; цифрами—характерные времена процессов

потребляются протоны из наружной фазы. Таким образом, перенос электрона через ФС I и ФС II эквивалентен транслокации двух протонов из наружной во внутреннюю фазу тилакоида. Освобождение протона при окислении воды занимает около 300 мкс, а захват протона из наружного пространства при восстановлении пластохинона и НАДФ происходит намного медленнее (60 мс) вследствие диффузионных барьеров в наружной поверхности мембраны. Не исключено также и дополнительное участие протонпереносящих белков, которое может вызывать наблюдаемые в экспериментах отклонения величины H^+/e^- от 2.

В первые моменты освещения появление электрического поля происходит

за счет локальных потенциалов, созданных в результате фотохимического переноса электрона ФС I и ФС II. Затем транслокация H^+ пластохиноном также дает свой вклад в разность электрических потенциалов, увеличивая положительный заряд внутри тилакоида. По направлению образованного поля происходит электрогенное движение хорошо проникающих через мембрану ионов, которые своими зарядами компенсируют мембранный электрический потенциал ($\Delta\phi$), тем самым облегчая перенос протонов и одновременно способствуя увеличению ΔpH . В хлоропластах такими компенсирующими ионами являются Mg^{2+} и Cl^- .

Возможна и противоположная ситуация, когда электрическое поле индуцирует стехиометрический обмен с протоном катионов — антипорт — и анионов — симпорт (см. § 2, гл. XXI). Если скорость антипорта и симпорта ионов близка к скорости транслокации протона ЭТЦ, химический потенциал протонов с каждой стороны мембраны будет возвращаться к исходному и значение ΔpH , создаваемое электронным транспортом, будет минимальным, а электрическая составляющая трансмембранного потенциала — максимально высокой. Наоборот, электрогенное движение заряженных ионов по направлению поля максимально увеличит ΔpH и уменьшит мембранный потенциал. В определенных условиях взаимодействие этих процессов может обратить в нуль сумму обоих компонентов, что фактически и происходит в присутствии разобщителей (см. § 2 гл. XXI). Таким образом, действительная величина электрохимического градиента в стационарных условиях будет зависеть от соотношения скоростей всех указанных процессов ионного транспорта.

Рассмотрим возможность использования самого понятия ΔpH внутри частиц малого размера, какими являются клеточные органеллы: хлоропласты, хроматофоры и митохондрии. При переносе протонов происходит подкисление внутренней фазы тилакоида и сдвиг pH до значений pH 5, что соответствует концентрации H^+ , равной 10^{-5} М в матриксе. Учитывая, что осмотический объем одного тилакоида составляет $(1 \div 6) \cdot 10^6$ нм³, нетрудно подсчитать, что в водной фазе внутритилакоидного пространства одного тилакоида находится всего лишь от 6 до 36 протонов. Это более чем на порядок ниже числа ЭТЦ в тилакоиде, которое приближается к ~ 300 . Между тем общее число протонов, перенесенных в тех же условиях стационарного освещения в отсутствие фосфорилирования во внутреннюю фазу тилакоида, составляет около 100 протонов на одну ЭТЦ. Это означает, что не менее 99% всех протонов связано во внутренней фазе с буферными группами, природа которых пока неизвестна.

При столь малых объемах поверхностные заряды мембраны также могут влиять на поведение ионов в прилегающем к мембране диффузном электрическом слое (см. § 5 гл. XVIII). Размеры данного слоя сравнимы с расстояниями между близкими поверхностями тилакоидных мембран, обращенных в сторону матрикса. Очевидно, значительная часть протонов не выходит внутрь тилакоида, а остается связанной внутри мембраны в метастабильных протонных пулах. Распределение H^+ внутри тилакоида носит не равномерный, а локальный характер, соответствующий протонсвязывающим свойствам участков мембраны. Вследствие такого рода латеральной гетерогенности тилакоидных мембран внутреннее пространство может разделяться на отдельные сравнительно изолированные друг от друга компартменты, между которыми протонное равновесие устанавливается медленно. В частности, известны данные, когда в ответ на короткие вспышки света происходит синтез АТФ, а значение pH внутри тилакоида практически не меняется, оставаясь около 7,5—8,0. Возможно, что протоны, выделяющиеся при разложении воды и окислении пластогидроксина, попадают к АТФ-синтетазным центрам, мигрируя вдоль поверхности мембраны и не выходя в водную фазу внутритилакоидного пространства.

Таким образом, следует иметь в виду, что использование параметра ΔpH в качестве компонента $\Delta \mu H^+$ как движущей силы синтеза АТФ носит в значительной степени условный характер. Действительная проблема состоит здесь не в значении $\Delta \mu H^+$ и сопоставлении его с количеством образованных молекул АТФ, а в механизмах внутримолекулярных превращений в АТФ-синтетазном комплексе.

§ 4. АТФазный комплекс

В настоящее время протонные АТФазы выделены практически из всех типов сопрягающих мембран: митохондрий, хлоропластов, хроматофоров. АТФазный комплекс, или H^+ -АТФаза,—обратимый фермент, обладающий как АТФ-синтетазной, так и АТФазной функциями. Синтез АТФ осуществляется за счет $\Delta \mu H^+$, а гидролиз АТФ приводит к тому, что протонная АТФаза сопряженно генерирует трансмембранную разность электрохимического потенциала H^+ . Таким образом, в H^+ -АТФазе происходят процессы по общей схеме



АТФазный комплекс (F_0F_1 -АТФаза) состоит из растворимой АТФазы (фактор F_1) и мембранных компонентов (комплекс F_0). Общая топография АТФазного комплекса приведена на рис. XXIV.8.

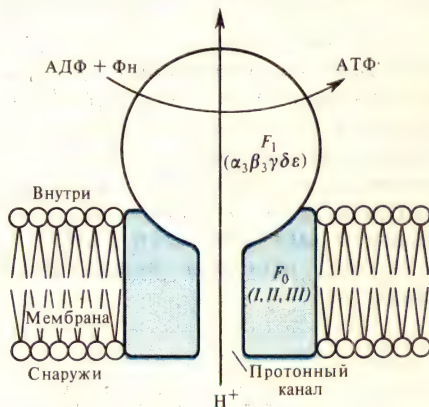


Рис. XXIV.8. Строение АТФазного комплекса

Сопрягающий фактор АТФазы (фактор F_1) представляет собой полифункциональный белок, имеющий сложную четвертичную структуру. Он построен из трех типов крупных субъединиц (α , β , γ с молекулярной массой 30 000—60 000) и двух типов минорных субъединиц (δ , ϵ с молекулярной массой 11 000—20 000). Сопрягающий фактор митохондрий соответствует составу $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Разложение его на отдельные субъединицы ведет к потере ферментативной активности. В молекулу сопрягающего фактора хлоропластов (CF_1) субъединицы входят в близких соотношениях. «Шляпка» грибовидного выроста H^+ -АТФазы соответствует фактору F_1 , частично погруженному в мембрану, а основание — гидрофобным белкам комплекса F_0 . Комплекс F_0 включает три типа полипептидов (I, II, III) с молекулярными массами от 6500 до 30 000 и обеспечивает связывание фактора F_1 с мембраной и перенос протонов при работе фермента

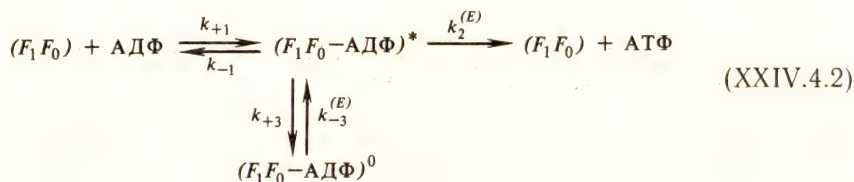
Считают, что F_0 формирует канал, по которому протоны поступают к активному центру АТФазы. Проводимость протонов носит специфический характер и подавляется антибиотиком олигомицином и ДЦКД (N, N'-дициклогек-

силкарбодимид) — ингибиторами H^+ -АТФазы. Особым образом организованный канал обеспечивает прохождение протона через всю мембрану из водной фазы в гидрофобную область мембраны, а затем из нее в воду по другую сторону липопротеинового барьера. Основную роль в переносе играет ДЦКД-связывающий протеолипид. Предполагают, что он располагается поперек мембраны, так что полярная часть оказывается на внешней поверхности мембраны митохондрий и служит входом в канал. Наиболее вероятным механизмом переноса протона представляется эстафетная передача по протон-донорным и протон-акцепторным группам аминокислот, включая остатки *арг*, *тир* и *глу*.

Предполагая, что индивидуальный перенос H^+ (либо вдоль водородных связей, либо путем туннелирования между центрами) происходит на величину, не превосходящую 0,2—0,3 нм, легко подсчитать, что для того, чтобы пересечь всю мембрану (4—5 нм), число групп должно быть не менее 15—20.

Для выяснения функции отдельных субъединиц был успешно использован иммунохимический анализ, а также различные препаративные методы, позволявшие получать молекулы F_1 без тех или иных субъединиц. Основные каталитические свойства фактора F_1 обеспечиваются α - и β -субъединицами, где расположены места связывания нуклеотидов с разным составом. α -Субъединица фермента содержит некаталитические центры, обладающие высоким сродством к АДФ и высокой специфичностью ее связывания. На β -субъединице локализованы активные центры АТФазной реакции, субстратом для которой служит комплекс Mg^{2+} -АТФ (свободные Mg^{2+} и АТФ — конкурентные ингибиторы фермента). Минорные субъединицы (γ , δ , ϵ), в отсутствие которых сохраняется АТФазная активность, обеспечивают процессы пассивной утечки H^+ через АТФазу, регуляцию АТФазной активности, а также связывание каталитического сектора с мембраной. Работа АТФазы сопровождается кооперативными конформационными перестройками, затрагивающими четвертичную структуру фермента, для чего требуется приток энергии. Так, в мембранах хлоропластов АТФаза находится в латентной форме, которая может активироваться с изменением четвертичной структуры при освещении в присутствии ионов Mg^{2+} и SH-групп, при создании на мембране протонного градиента или действии внешнего электрического поля.

Схему перехода между различными состояниями можно представить в виде



где $(F_1F_0\text{-АДФ})^*$ и $(F_1F_0\text{-АДФ})^0$ — активная и неактивная формы H^+ -АТФазы в комплексе с АДФ, индекс E в символах $k_2^{(E)}$, $k_{-3}^{(E)}$ означает, что соответствующие процессы требуют притока энергии. Характерные времена переходов ($1/k_{+3} \approx 1/k_{-3}$) между состояниями (*) и (0) должны составлять несколько секунд, что намного медленнее, чем непосредственные реакции синтеза и гидролиза АТФ (10^{-2} — 10^{-3} с). Отсюда следует, что энергизация H^+ -АТФазы происходит не во время ее функционирования, а предшествует ему.

§ 5. Механизмы энергетического сопряжения

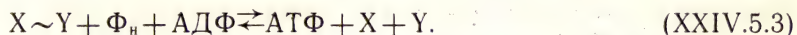
Существует большое количество различных гипотез относительно механизма мембранного фосфорилирования, которые отличаются друг от друга включением в схемы синтеза АТФ различных окислительно-восстановительных реакций и компонентов сопряжения при трансформации энергии. На ранних этапах предлагали схемы непосредственного сопряжения переноса электронов в ЭТЦ с синтезом АТФ. В химических гипотезах сопряжения предполагали образование высокоэнергетического соединения переносчика электрона (А) и интермедиата (Х), участвующего в процессе фосфорилирования на стадии:



На следующей стадии энергия от $\text{A} \sim \text{X}$ переносится к $\text{X} \sim \text{Y}$, где Y является интермедиатом только в процессах фосфорилирования и не содержит компонентов ЭТЦ:



Наконец, на третьем этапе происходит фосфорилиз нефосфорилированного макроэрга $\text{X} \sim \text{Y}$ и трансфосфорилирование до химически стабильной молекулы АТФ:



Как видно их реакций (XXIV.5.1) — (XXIV.5.3), перенос энергии от пары (AH_2 , В) на АТФ осуществляется путем сдвига вправо химического равновесия, ведущего к появлению избытка АТФ.

Возможно ли осуществление этого принципа в биологических мембранах? Согласно расчетам, макроэргический характер фосфатной связи в АТФ обусловлен энергией отталкивания атомов вследствие избыточной отрицательной электронной плотности на атомах кислорода в фосфорных остатках. Поэтому сама макроэргическая связь $\sim \text{P}$ может образовываться за счет направленного индукционного перемещения электронной плотности в промежуточных соединениях, при котором избыток электронной энергии не диссипирует в теплоту за время гидролиза. Следовательно, для осуществления эффективного энергетического сопряжения способом смещения химического равновесия необходимо, чтобы избыток электронной энергии, сосредоточенный на химических связях промежуточных нестабильных соединений, за время реакции не диссипировал в теплоту, а сохранялся, трансформируясь без потерь в энергию конечного стабильного макроэргического соединения (АТФ).

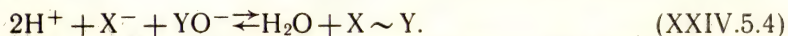
Известно (см. гл. X—XII), что рассеяние избытка энергии в процессах электронно-колебательной релаксации в конденсированной фазе протекает за 10^{-11} — 10^{-12} с. Это означает, что бездиссипативная передача энергии по химическому пути возможна, если весь процесс трансформации энергии произойдет в один элементарный акт за 10^{-11} — 10^{-12} с. Только в этом случае избыток электронной энергии, сосредоточенный на определенных связях атомных групп нестабильных промежуточных соединений, не успеет диссипировать в теплоту в ходе электронно-колебательной релаксации. Ясно, насколько трудно осуществить последовательно все превращения (XXIV.5.1) — (XXIV.5.3) за столь короткое время. Это тем более очевидно, что в процессе должны принимать участие несколько низкомолекулярных соединений, которые, согласно предположению, исходно пространственно разделены в мембране, а затем диффундируют к месту реакции. Отсюда следует важный вывод, что высокоэффективное энергетическое сопряжение, основанное на сдвиге химического равновесия в цепи реакций, включающих нестабильные соеди-

нения, не может осуществляться в конденсированной фазе. Для этого необходим единый комплекс молекул, где трансформация энергии происходит в один акт без тепловых потерь. Именно таким комплексом и является АТФ-синтетаза.

Синтез АТФ из АДФ и Φ_n может происходить в мембранных везикулах и в отсутствие переносчиков электронов. Для этого необходимо лишь тем или иным образом создать трансмембранную разность электрохимических потенциалов H^+ на мембране, в которой находится АТФ-синтетаза. Такого рода процессы синтеза АТФ наблюдаются в липосомах из фосфолипидов, в состав которых помимо АТФ-синтетазы входит бактериородопсин (см. гл. XXIX), способный под действием света переносить H^+ через мембраны. Аналогично, синтез АТФ можно осуществить, создав разность $\Delta\mu H^+$ с помощью «кислотно-щелочного удара» или прикладывая разность электрических потенциалов. В действительности проблема состоит в том, чтобы понять, каким образом компоненты $\Delta\mu H^+$ взаимодействуют с H^+ -АТФазой, не вовлекая непосредственно перенос электрона в ЭТЦ.

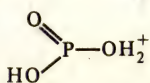
Хемиосмотический принцип трансформации энергии не может объяснить непосредственного молекулярного механизма синтеза АТФ. Согласно одному из первых вариантов хемиосмотической гипотезы, образование АТФ сопряжено с распадом высокоэнергетического предшественника $X \sim Y$. Считали, что существуют некие компоненты (подвижные в липидах ионы) X и Y , находящиеся в мембране в виде XN и YOH , которые могут диссоциировать: $XN \rightleftharpoons X^- + H^+$; $YOH \rightleftharpoons YO^- + H^+$.

В митохондриальной мембране у внешней стороны происходит реакция конденсации



Эта реакция сильно сдвинута вправо за счет повышения трансмембранного $\Delta\mu H$ и движения анионов X^- и YO^- к внешней поверхности под действием сил трансмембранного электрического поля. На схеме (XXIV.5.4) природа X и Y по-прежнему остается неизвестной. Однако главный недостаток хемиосмотического принципа сопряжения состоит в том, что роль $\Delta\mu H^+$ здесь сводится лишь к пассивному фактору, сдвигающему химические равновесия в системе реакций. В самом деле, величина $\Delta\mu H^+$ в соответствии с представлениями классической термодинамики и кинетики определяет среднестатистическую вероятность, или среднее число актов переноса протонов между поверхностями мембраны, разделенными энергетическим барьером $\Delta\mu H^+$ [ср. (XIV.1.1)]. Однако само по себе значение $\Delta\mu H^+$ не раскрывает молекулярных механизмов процесса прохождения единичного протона через H^+ -АТФ-синтетазу и синтеза АТФ в активном центре. Иными словами, несмотря на успех хемиосмотической теории, доказавшей роль $\Delta\mu H^+$ в качестве движущей силы синтеза АТФ, одного лишь наличия концентрационного градиента протонов недостаточно для понимания молекулярного механизма этого процесса. Необходимо принимать во внимание активную роль протонов, непосредственно взаимодействующих с макромолекулярным комплексом H^+ -АТФазы.

В этой связи была высказана идея (П. Митчел) о том, что в активный центр АТФазы нагнетаются протоны, которые непосредственно восстанавливают фосфорильный кислород неорганического фосфата в активном центре,



образуя соединения типа $HO-P(=O)(OH_2^+)-OH_2^+$. Преодоление энергетического барьера элементарного акта синтеза АТФ достигается за счет «горячих» протонов, которые разгоняются электрическим полем в протонном канале

H^+ -АТФазы. Таким образом, передача энергии $\Delta\mu H^+$ должна была бы осуществляться здесь путем трансформации кинетической энергии протонов. Но в конденсированной фазе, где релаксация возбужденных степеней свободы происходит быстро (10^{-11} — 10^{-12} с), такой механизм также невозможен. Не спасает положение и представление о некоем аккумуляторе, в котором должны накапливаться протоны, движущиеся внутри АТФ-синтетазы до тех пор, пока не наберется энергия, достаточная для синтеза одной молекулы АТФ.

Можно было бы попытаться использовать только электрическую составляющую $\Delta\phi$ в качестве движущей силы, смещающей полярные группы в ходе элементарного акта. Однако тогда необходимо сделать предположение, что все падение напряжения на мембране реализуется в активном центре на расстояниях действия химических или, в крайнем случае, жемолекулярных сил, т. е. на 0,3—0,4 нм. Это представляется нереальным (Л. А. Блюменфельд).

В действительности проблему синтеза АТФ в H^+ -АТФ синтетазе следует рассматривать исходя из общих представлений о роли электронно-конформационных взаимодействий в механизмах ферментативного катализа.

Как известно, элементарный акт катализа осуществляется в активном центре фермента спонтанно, когда в нем достигается реакционноспособная конфигурация между реагирующими группами субстрата и фермента, расположенными на расстояниях порядка длин химических связей. На стадиях взаимодействия субстрата и фермента при образовании активной конфигурации и затем при отщеплении образовавшегося продукта в ферменте происходят конформационные изменения. Такие внешние факторы, как температура, ионная сила раствора, вязкость, могут влиять на эти релаксационные стадии. Однако непосредственный акт катализа в сформированной активной конфигурации уже не требует тепловой энергии активации.

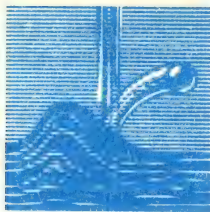
С этими представлениями хорошо согласуются данные Дж. Бойера. Элементарный акт образования АТФ может происходить в активном центре H^+ -АТФазы в условиях деэнергизации мембраны, когда $\Delta\mu H^+ = 0$, и даже в активном центре изолированного фактора F_1 , находящегося в растворе. Однако валовой синтез АТФ при деэнергизации практически не происходит. Изучение реакций изотопного обмена ^{18}O ($ATP \rightleftharpoons H_2^{18}O$) показало, что стадией, определяющей крайне низкую скорость валового синтеза АТФ в отсутствие $\Delta\mu H^+$, является освобождение синтезированного АТФ из активного центра (П. Д. Бойер). Именно этот процесс ускоряется (в 1000 раз) при энергизации мембраны. Таким образом, энергия $\Delta\mu H^+$ используется в основном для вытеснения прочносвязанного АТФ из каталитического центра фермента. Энергия также расходуется и при связывании ферментом фосфата и АДФ, причем каталитические центры функционируют, чередуясь в определенном порядке. Все это означает, что энергия $\Delta\mu H^+$ расходуется не на стадии элементарного акта образования ковалентной связи $ADP \sim P$ в активном центре фермента, а влияет на процессы связывания ферментом субстрата и освобождения продукта реакции из активного центра.

В настоящее время обсуждаются модели кооперативного взаимодействия субъединиц F_1 , предполагающие альтернативное функционирование двух активных центров. Согласно одной из схем, в комплексе существует два активных центра, которые могут находиться либо в открытом, либо в закрытом состоянии. Связывание АДФ и Ф в одном центре вызывает такое изменение конформации, которое способствует высвобождению АТФ. Аналогично этому, в процессе гидролиза АТФ связывание и гидролиз АТФ приводят к быстрой диссоциации АДФ и Ф_н из альтернативного центра. Роль компонентов $\Delta\mu H^+$ состоит в протонировании определенных молекулярных групп (ΔpH) или изменении положения полярных групп под действием электрического поля ($\Delta\phi$).

При этом (см. § 3 гл. XIV) изменяется характер движения отдельных групп белка в конформационном потенциале. Это и может непосредственно влиять на формирование фермент-субстратного комплекса при связывании субстрата и на отщепление продукта реакции, т. е. на процессы, происходящие в ходе конформационной релаксации.

Рассмотрим в связи с этим гипотезу о транслокации субстратов как необходимого этапа в трансформации энергии в H^+ -АТФазе (И. В. Козлов, Я. Кагава). На первой стадии происходит депротонирование субстратов и связывание анионов ADP^{3-} и P^{3-} в некаталитическом центре на α -субъединице; затем конформационный поворот α и β -субъединиц фактора F_1 , в результате чего неактивный центр вступает в контакт с активным и передает ему АДФ и Φ_n . Одновременно в неактивный центр переходит АТФ, синтезированная в предыдущем цикле. Синтез АТФ в активном центре проходил с участием двух протонов, поступивших по протонпроводящему каналу. Теперь же энергия $\Delta\phi$ в неактивном центре используется для движения комплекса предсинтезированной ATP^{4-} с лигандами некаталитического центра $[ATP Mg 3RNH_3]^{2+}$ к внутренней поверхности мембраны, где и происходит диссоциация АТФ в матрикс. Когда движущей силой синтеза АТФ является ΔpH , а не $\Delta\phi$, то транслокация положительно заряженного комплекса АТФ с лигандами осуществляется под действием локальных электрических полей, которые возникают при протонировании аминокислотных остатков вблизи активного центра и депротонировании остатков вблизи некаталитического центра. В целом процессы связывания АТФ и субстрата $ADP + \Phi_n$ в активном и неактивном центрах должны быть строго сбалансированы по зарядам, что может достигаться фиксированной системой положительно (NH_3^+ , Mg^{2+}) и отрицательно (COO^-) заряженных групп.

Таким образом, кооперативная перестройка структуры H^+ -АТФазы свидетельствует о направленном характере электронно-конформационных взаимодействий, лежащих в основе синтеза АТФ как акта ферментативного катализа. Движущая сила — компоненты ΔpH — изменяет электронное состояние в локальной области активного центра, переводя фермент в конформационно-напряженное состояние (см. § 2 гл. XIV). В результате этого развиваются конформационно-релаксационные процессы и происходит изменение четвертичной структуры, что необходимо как для связывания субстрата, так и отщепления продуктов реакции, образовавшихся в активном центре.



§ 1. Общая характеристика механохимических процессов

При мышечном сокращении механическая работа совершается организованным в надмолекулярную структуру ферментом за счет энергии катализируемой им реакции гидролиза АТФ, т. е. рабочим телом преобразователя энергии в этом случае является белок, механические свойства которого изменяются в ходе ферментативного процесса.

Изменения формы полимеров при химической реакции (сорбция лиганда) известны; они лежат в основе искусственных механохимических преобразователей энергии, работающих за счет энергии переноса лиганда по градиенту концентрации.

Аналогичные механохимические преобразователи известны в биологии: за счет переноса H^+ по градиенту электрохимического потенциала работают бактериальные жгутики, у некоторых простейших за счет переноса Ca^{2+} функционирует сократительная органелла — спазмонема, которая укорачивается при связывании Ca^{2+} . Молекулярные механизмы электронно-конформационных взаимодействий, приводящих к большим изменениям формы молекул при локальных изменениях в РЦ, в настоящее время изучены недостаточно. Их выяснение необходимо для понимания механизмов функционирования любого механохимического преобразователя энергии.

Каждый длительно работающий преобразователь энергии обязательно работает циклически. В результате совершения полного цикла изменения происходят только в окружающей среде (источник и нагрузка), а сам преобразователь возвращается в начальное состояние. В ходе этого цикла рабочее тело получает энергию от источника и, претерпевая некоторые изменения, передает ее нагрузке во время рабочего хода, после чего преобразователь возвращается в исходное состояние (обратный ход).

При постоянных температуре (T) и давлении (p) изменение термодинамического потенциала Гиббса (G) рабочего тела в ходе механохимического процесса равно

$$dG = fdl + \sum \mu_i dn_i, \quad (XXV.1.1)$$

где $G = U + pV - TS$ (см. V.1.6), f — растягивающая внешняя сила, dl — изменение длины, dn_i — количество молей i -го компонента (лиганд), полученного рабочим телом при химическом потенциале μ_i (см. § 1 гл. V).

После завершения цикла $\oint dG = 0$, а значение совершенной механической работы W составит, очевидно,

$$W = -\oint fdl = \oint \sum \mu_i dn_i. \quad (XXV.1.2)$$

Таким образом, в обратимом цикле механическая работа равна изменению свободной энергии при переносе вещества по градиенту концентрации.

Эффективность реального неравновесного цикла определяется величиной

$$\eta = -\oint fdl / \oint \sum \mu_i dn_i, \quad (XXV.1.3)$$

которая определяет отношение произведенной работы к максимально возможной. Очевидно, в этом случае $\eta < 1$, т. е. механическая работа сопровождается большим по величине уменьшением химической энергии (см. § 3 гл. V). Для функционирования механохимического преобразователя достаточно одного переносимого лиганда.

Сила f и химический потенциал μ не могут быть функциями только своей сопряженной переменной, так как в этом случае при $f=f(l)$ и $\mu=\mu(n)$ механическая и химическая работы цикла были бы равны нулю: $\oint f(l)dl=0$ и $\oint \mu(n)dn=0$. Следовательно, необходимо, чтобы сила зависела не только от длины, но и от химического потенциала:

$$(\partial f / \partial \mu)_l \neq 0. \quad (\text{XXV.1.4})$$

В этом случае количество лиганда, связанного рабочим телом, в свою очередь, будет зависеть не только от его химического потенциала, но и от длины, поскольку химическая и механическая степени свободы рабочего тела взаимозависимы:

$$(\partial f / \partial \mu)_l = -(\partial n / \partial l)_\mu. \quad (\text{XXV.1.5})$$

Это соотношение легко получить после перехода в (XXV.1.1) к термодинамическому потенциалу $\Psi = G - \mu n$ из равенства $\partial^2 \Psi / \partial l \partial \mu = \partial^2 \Psi / \partial \mu \partial l$. В преобразователях, использующих энергию переноса лиганда по градиенту концентрации, для получения работы $W \neq 0$ за цикл необходимо производить прямой и обратный ход рабочего тела при разном химическом потенциале, т. е. при контакте с разными частями источника энергии, который в этом случае физически представляет собой растворы с разными концентрациями лиганда. Следовательно, должен существовать регулятор кинетики взаимодействия рабочего тела с разными частями источника на разных стадиях механического цикла.

В простейшем случае можно представить себе рабочее тело как цепочку из последовательно соединенных молекул полимера, форма которых изменяется при реакции связывания лиганда



где E — молекула полимера, S — лиганд, X — их комплекс. Работа осуществляется за счет изменения длины полимерных молекул в направлении силы. По-видимому, так работает сократительная система сувоек — спазмонема, в которой связывание Ca^{2+} вызывает укорочение белковых структур. Прохождение цикла сокращения — расслабления определяется изменениями концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, которые создаются ретикуломом.

В большинстве систем биологической подвижности рабочим телом является организованный в надмолекулярную структуру белок-фермент, использующий энергию катализируемой им реакции $S \rightleftharpoons P$. В этом случае (различные типы мышц, движение протоплазмы, жгутики эукариот, митотический аппарат) преобразователи функционируют при постоянном химическом потенциале. Изменения потенциала (например, концентрация Ca^{2+} в мышцах) носят регуляторный характер и только «включают» систему, которая длительно работает при постоянной концентрации Ca^{2+} . В простейшем случае белок катализирует реакцию согласно схеме



где X — фермент-субстратный комплекс (см. гл. XIV).

В этом случае субстрат и продукт реакции, разделенные кинетическим барьером, аналогичны по смыслу растворам с разной концентрацией лиганда. Поэтому фермент, механические свойства которого различны в состояниях E и X , может быть циклическим механохимическим преобразователем энергии при условии изменения кинетики взаимодействия с субстратом и продуктом в ходе механического цикла. Это достигается изменением кинетического параметра k_2/k_{-1} , задающим отношение скоростей переходов между состояниями E и X по двум путям. Это отношение должно быть различным на разных механических стадиях цикла. Например, если во время рабочего хода происходит в основном переход $E + S \rightleftharpoons X$, то на стадии обращения должен главным образом происходить переход $X \rightleftharpoons E + P$. Таким образом, изменение параметра k_2/k_{-1} выполняет роль смены растворов в преобразователях, работающих за счет переноса лиганда по градиенту концентрации. Отличие заключается в том, что в данном случае регулирование должно осуществляться на молекулярном уровне путем изменения кинетических констант. В предельном случае, когда $k_2/k_{-1} = \infty$ на одной стадии механического цикла и $k_2/k_{-1} = 0$ — на другой, эффективность преобразования при равновесном проведении цикла равна 100%. Без изменения этого кинетического параметра в ходе цикла нельзя провести механохимический цикл, в котором работа производится белком.

Таким образом, задачей биофизики мышцы на молекулярном уровне является выяснение типов и механизмов молекулярных перестроек белковых структур в ходе катализа, а также механизмов регуляции кинетических свойств фермента, обеспечивающих циклическое протекание процессов преобразования

§ 2. Основные свойства поперечно-полосатой мышцы как механохимического преобразователя энергии

Скелетная мышца позвоночных состоит из отдельных многоядерных клеток — мышечных волокон длиной от нескольких миллиметров до десятков сантиметров и толщиной обычно 0,05—0,1 мм. Волокна разделены поперечными структурами (Z-пластинками) на одинаковые участки — саркомеры, длина которых в покоящейся мышце составляет $\sim 2,2$ мкм. Переход волокон из расслабленного состояния в активное происходит в результате вызванного нервным импульсом выброса Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулула. После окончания активации концентрация Ca^{2+} понижается до величин, меньших порогового значения ($\sim 10^{-7}$ М), за счет работы Ca^{2+} -насоса ретикулула, и мышца расслабляется. При активации мышца укорачивается или только развивает силу, если ее длина фиксирована — изометрическое сокращение. Значительная часть сведений о механических и энергетических свойствах мышцы получена А. Хиллом. Согласно эмпирическому уравнению Хилла, стационарная зависимость между силой и скоростью описывается гиперболой со смещенными осями (рис. XXV.1.1):

$$(p+a)(v+b)=(p_0+a)b=a(v_{\max}+b), \quad (\text{XXV.2.1})$$

где p_0 — изометрическая сила ($p=p_0$ при $v=0$), v_{\max} — максимальная скорость укорочения мышцы ($v=v_{\max}$ при $p=0$), a и b — константы. Форма уравнения Хилла указывает на то, что в мышце существует внутренняя нагрузка вязкого типа (т. е. зависящая от скорости), которая препятствует укорочению.

При одинаковом режиме стимуляции энергопродукция мышцы повышается по сравнению с изометрическим сокращением, если мышце позволить укорачиваться (эффект Фенна), и скорость энергопродукции зависит от скорости

укорочения (рис. XXV.1, II). Следовательно, энергопродукция мышцы регулируется режимом работы ее сократительного аппарата. Эффективность преобразования энергии при стационарном мышечном сокращении, измеренная как

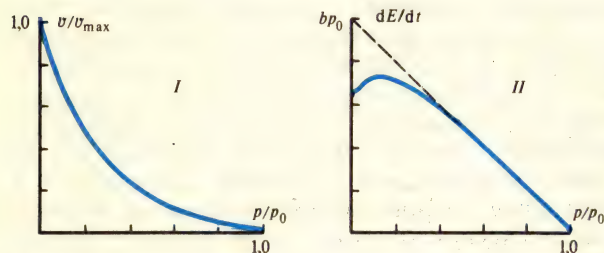


Рис. XXV.1. Свойства стационарного укорочения мышцы:

I—зависимость относительной скорости от относительной силы, II—превышение скорости выделения энергии (теплота + работа) над изометрическим уровнем в зависимости от относительной силы; сплошной линией показаны экспериментальные данные, пунктиром — теоретическая зависимость (объяснение см. в тексте).

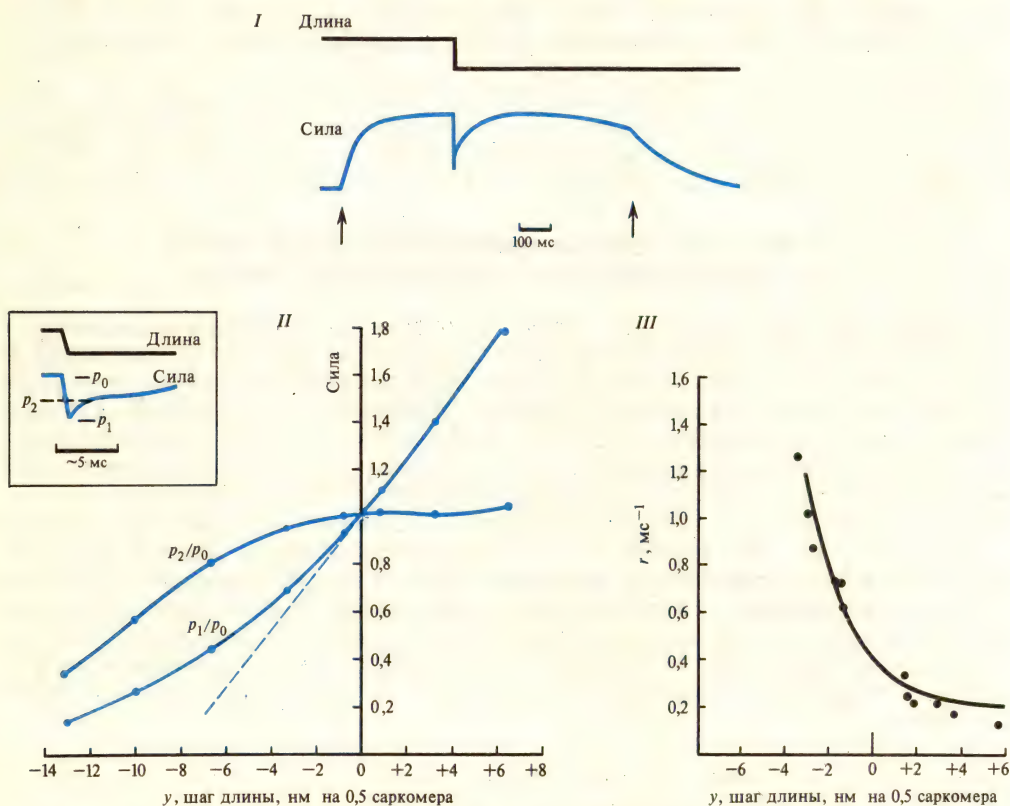


Рис. XXV.2. Свойства мышечного волокна при быстрых изменениях его длины (по А. Ф. Huxley, R. M. Simmons, 1971):

I—экспериментальная запись ответа на быстрое изменение длины (стрелками указаны начало и конец стимуляции); II—зависимость экстремального значения силы (p_1), достигаемого во время быстрого изменения длины, и силы (p_2), достигаемой в течение быстрого восстановления, от величины изменения длины (y). Способ определения величин p_1 и p_2 схематически указан слева в рамке; пунктиром показана экстраполяция кривой p_1/p_0 по данным для растяжения и малых укорочений; III—зависимость константы скорости фазы быстрого восстановления силы от величины изменения длины

отношение работа/(работа+теплота), почти постоянна в широком диапазоне нагрузок (от 0,2 до 0,8 p_0) и достигает 40%. Эффективность работы сократительной системы должна быть выше, так как часть теплоты выделяется в системе, обеспечивающей изменение концентрации Ca^{2+} . Укорочение мышцы сопровождается гидролизом АТФ, энергии которого достаточно для обеспечения совершаемой работы, но не полной энергопродукции. Источник энергии для полной энергопродукции мышцы остается пока неясным.

При очень быстром изменении длины изометрически сокращенной мышцы ее сила изменяется почти пропорционально длине, а затем восстанавливается до исходного уровня (рис. XXV.2, I, II). Величина «отпускания» волокна, при котором сила падает до нуля, позволяет определить величину растяжения упругих элементов сократительной системы, которая оказывается ~ 8 нм на $1/2$ саркомера (рис. XXV.2, II). Восстановление силы происходит в несколько этапов. Вначале наблюдается быстрое восстановление силы до некоторого промежуточного уровня (рис. XXV.2, II, схема в рамке). Скорость этого процесса возрастает с величиной быстрого укорочения. При значительных укорочениях он становится таким быстрым, что частичное восстановление силы происходит уже во время отпускания волокна. Этим объясняется отклонение кривой p_1/p_0 от линейности. Затем некоторое время сила держится на постоянном уровне, после чего медленно восстанавливается до исходной величины (рис. XXV.2, I). Таким образом, кинетика восстановления силы после быстрого изменения длины показывает, что в сократительной системе происходят процессы, сильно различающиеся по временным характеристикам.

§ 3. Структуры саркомера и их изменения при сокращении

Большая часть объема волокна занята миофибриллами — продольно расположенными субклеточными структурами диаметром 1—2 мкм без видимой внешней оболочки. В миофибриллах от соседних Z-пластинок навстречу друг другу отходят две системы тонких нитей. Между ними расположена система толстых нитей, которая частично перекрывается с системой тонких нитей. Периодическое повторение такой структуры обеспечивает поперечную исчерченность волокна. Тонкие нити состоят из актина, упакованного в двойную спираль (рис. XXV.3). Кроме актина тонкие нити содержат Ca^{2+} -чувствительный регуляторный комплекс из тропонина и тропомиозина. Толстые нити состоят из миозина. Миозиновая молекула содержит механически не эквивалентные области — почти полностью спирализованные участки и неупорядоченные «шарнирные» области. Один такой шарнир соединяет легкий меромиозин, находящийся в стволе толстой нити, с выступающей из ствола частью молекулы — тяжелым меромиозином. Второй шарнир соединяет спиральную часть тяжелого меромиозина (субфрагмент-2) с двумя глобулярными головками (субфрагменты-1), каждая из которых содержит активный и актинсвязывающий центры. Осевое расстояние между одинаково расположенными мостиками, миозиновыми выступами, 42,9 нм. В средней части нитей мостики отсутствуют.

В покоящейся мышце мостики не взаимодействуют с актином, поэтому такая мышца легко растяжима. При активации ионы Ca связываются с регуляторным комплексом тонких нитей, в которых происходят структурные изменения, интерпретируемые как смещение положения тропомиозинового тяжа на актиновой нити. В результате этого актиновые центры становятся доступными для взаимодействия с миозиновыми мостиками. Структура самих толстых нитей почти не изменяется, но происходит отход мостиков от ствола толстой нити по направлению к тонкой и нарушение упорядоченности их расположения.

В покоей мышце мостики расположены под прямым углом к осям нитей; видимо, при сокращении угол наклона мостиков меняется (рис. XXV.3, II), в результате чего активный центр, к которому присоединен мостик (на рисунке этот центр зачернен), может передвинуться на один «шаг».

Таким образом, подвижной частью структуры при сокращении являются мостики. Укорочение мышцы не изменяет длины самих нитей, происходит

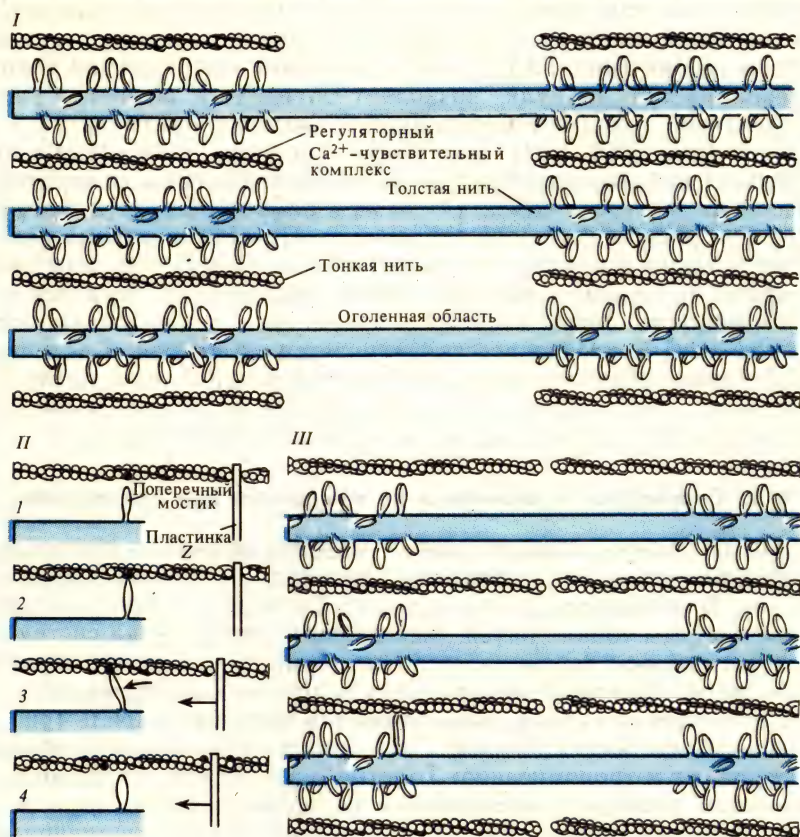


Рис. XXV.3. Структурная организация саркомера и происходящие в ней изменения при укорочении (по Дж. Меррэй, А. Веберу, 1977):

I—до начала укорочения; II—цикл взаимодействия мостика с актиновой нитью, приводящий к относительному перемещению толстой и тонкой нитей; III—после укорочения в результате циклической работы мостиков; 1—4 — последовательные стадии взаимодействия мостика с актиновой нитью (остальные объяснения см. в тексте)

лишь их относительное движение: решетка миозиновых нитей вдвигается в решетку актиновых нитей (А. Хаксли). Такая кинематика движения надмолекулярных структур при укорочении мышцы называется схемой скользящих нитей.

Значение силы, развиваемой мышцей в изометрическом сокращении, зависит от длины саркомера, т. е. от степени перекрытия нитей (рис. XXV.4). При этом сила не изменяется в той области длин саркомера, где число мостиков в зоне перекрытия нитей остается постоянным (около длины покоя мышцы). При растяжении саркомера сила уменьшается линейно с изменением зоны

перекрытия нитей, т. е. сила пропорциональна числу потенциально возможных контактов актина и миозина. Поэтому считают, что образование контактов миозиновых мостиков с актином ответственно за развитие силы. Увеличение жесткости мышцы при активации поддерживает это представление.

Итак, образование связи миозинового мостика с актином приводит к возникновению силы, а если мышца может укорачиваться — к скольжению нитей

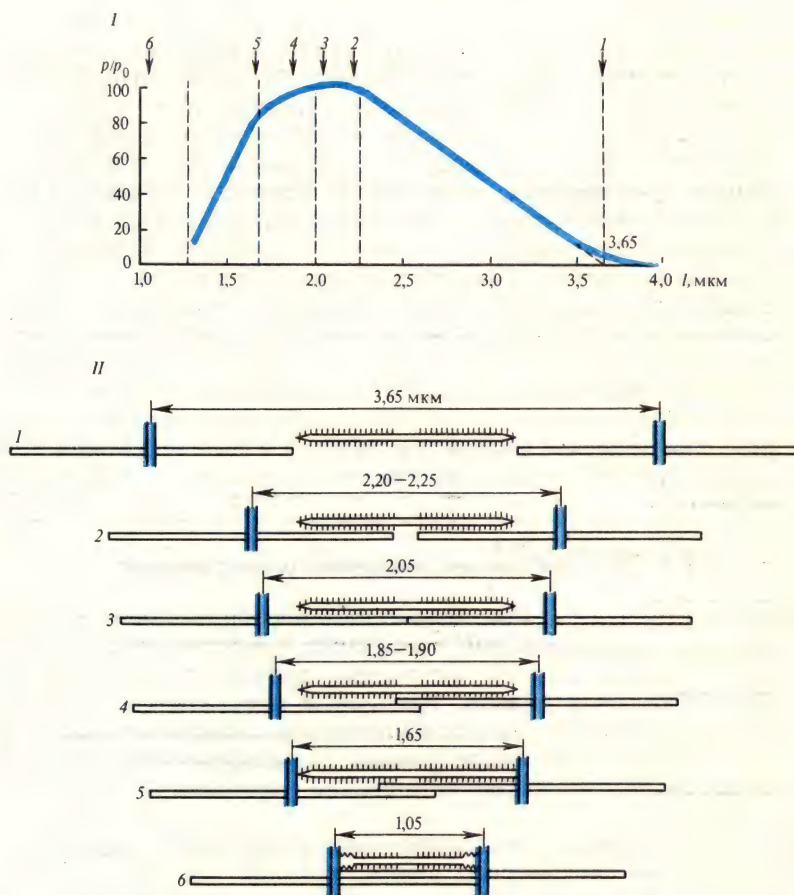


Рис. XXV.4. Зависимость изометрической силы мышечного волокна от степени перекрытия нитей (по А. М. Gordon, А. F. Huxley, F. J. Julian, 1966):

I—изометрическая сила, развиваемая поперечно-полосатой мышцей при различных длинах саркомера l , измеренная на одиночных волокнах; II—изменение зоны перекрытия толстых и тонких нитей при различных длинах саркомера; 1—6—обозначения одинаковых длин саркомера на I и II

до тех пор, пока сила мостика не упадет до нуля, после чего мостик должен разомкнуться. Если размыкания не произойдет, мостик будет препятствовать дальнейшему скольжению нитей. Скольжение нитей под влиянием изменений мостика, присоединенного к актиновому мономеру, иллюстрируется на рис. XXV.3, II. При укорочении мышцы относительное смещение нитей значительно превышает «шаг» мостика. Поэтому из схемы скольжения нитей следует, что мостик должен работать циклически. Путь мостика, на котором он развивает

силу, направленную к центру саркомера, можно рассматривать как рабочий ход, а дальнейшее движение — как обратный ход мостика. В ходе этого цикла расходуется АТФ. Во время рабочего хода мостик преобразует свободную энергию гидролиза АТФ в механическую работу. Во время обратного хода на обращение состояния мостика затрачивается часть энергии АТФ, которая преобразуется другими мостиками, обеспечивающими скольжение нитей.

Таким образом, элементарным механохимическим процессом в мышце является полный цикл превращений мостика, в ходе которого совершается механическая работа за счет свободной энергии гидролиза АТФ.

Основные сведения о механизме гидролиза АТФ получены из исследований, проведенных на растворах мышечных белков. В физиологических условиях миозин является очень «плохим» ферментом: стационарная скорость гидролиза АТФ очень мала: $\sim 0,05 \text{ с}^{-1}$. Этот процесс ускоряется актином примерно на три порядка. АТФ очень прочно связывается с миозином, что обеспечивает быструю диссоциацию актомиозина, несмотря на большую прочность актомиозиновой связи. Затем на свободном миозине происходит гидролиз АТФ и долгоживущий миозинпродуктный комплекс соединяется с актином. Большая свободная энергия переходов, связанных с десорбцией продуктов гидролиза АТФ от актомиозина (более 50% свободной энергии реакции гидролиза АТФ), может быть использована для совершения работы в мышце. Основное освобождение свободной энергии гидролиза АТФ происходит при десорбции фосфата.

При сопоставлении указанных свойств реакции в растворах с характеристиками механохимического цикла мостика необходимо учитывать, что термодинамические и кинетические параметры реакции в мышце должны изменяться в связи со структурными ограничениями, приводящими к деформациям белкового комплекса.

§ 4. Моделирование мышечного сокращения

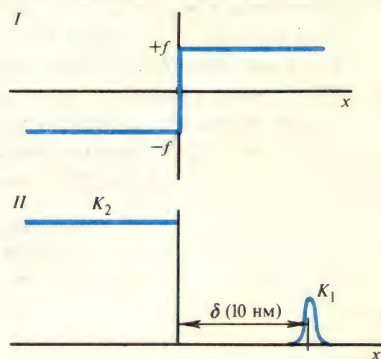
Для понимания механизма механохимического преобразования энергии в мышце математическое моделирование составляет существенную часть исследований. Модели составляются на основании данных о структуре мышцы и свойствах kontrakтильных белков. Критерием адекватности модели служит степень совпадения описания макроскопических свойств мышцы (например, механика сокращения и энергопродукция) с экспериментальными результатами. Основной прогресс в этой области связан с именами А. Хаксли, В. И. Дешеревского, Т. Хилла.

Основы математического моделирования мышечного сокращения. Силы, развиваемые каждым саркомером, равны, так как эти элементы соединены последовательно, а распределенностью массы волокна в большинстве режимов сокращения можно пренебречь. Сила волокна равна сумме сил мостиков в слое толщиной 0,5 саркомера, поскольку в этом слое мостики соединены параллельно, а правая и левая половины саркомера зеркально-симметричны. Скорость изменения длины волокна составляет $v = 2Nv'$, где N — число саркомеров в волокне, а v' — относительная скорость скольжения нитей. Эквивалентно ориентированные мостики находятся на расстоянии 42,9 нм, а диапазон перемещений замкнутого мостика не превышает 10—20 нм. Поэтому около свободного мостика может находиться только свободный актиновый центр. Следовательно, процессы образования и распада мостиков описываются уравнениями мономолекулярной кинетики.

Сила, приходящаяся на один мостик в зоне перекрытия нитей, не зависит от степени перекрытия нитей, несмотря на изменение расстояния между нитями. Из этого следует, что мостики функционируют независимо, а мышца

может рассматриваться как одномерная система, т. е. свойства мостика могут описываться только одной механической координатой — расстоянием вдоль оси нитей между основанием мостика на толстой нити и актиновым центром, с которым он может взаимодействовать. Для простоты обычно предполагают, что существует только одна актиновая глобула для каждого мостика (на рис. XXV.3, II такой актиновый центр зачернен). Механическая координата мостика может изменяться только при скольжении нитей.

Рис. XXV.5. Схема зависимости силы мостика (I) и констант замыкания (k_1) и размыкания (k_2) мостика (II) от механической координаты в модели Дещеревского (объяснение см. в тексте)



Исследование процессов восстановления силы после быстрого укорочения мышечного волокна при разных длинах саркомера показало, что кинетика этого процесса не зависит от величины зоны перекрытия нитей и, следовательно, определяется свойствами мостиков. Таким образом, в механохимическом цикле мостика происходят процессы, сильно различающиеся по временным характеристикам (см. рис. XXV.2), поэтому возможен отдельный анализ сокращения в физиологическом диапазоне скоростей изменения длины, при котором быстрые процессы являются квазиравновесными. Эти быстрые процессы при таких режимах сокращения определяют эффективные параметры механохимического цикла.

Механохимия физиологических режимов сокращения. Для описания таких режимов достаточно предположения о том, что мостик может существовать только в двух механических состояниях: замкнутом и разомкнутом. Ниже рассматривается модель Дещеревского, которая наиболее проста (сокращение мышцы описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений) и поэтому позволяет относительно несложно проводить анализ сокращения, аналитически получить уравнение Хилла и оценить параметры элементарного цикла мостика. Простота модели определяется выбором зависимости силы мостика и констант скоростей процессов замыкания и размыкания мостика от его механической координаты (рис. XXV.5). В модели предполагается, что мостик может замыкаться в небольшой зоне, где он развивает силу (f), направленную к центру саркомера. Эта зона наиболее удалена от механической координаты, в которой сила меняет знак, т. е. там, где мостик начинает тормозить движение. Следовательно, при скольжении нитей замкнувшийся мостик совершит максимальную работу. Это обеспечивается также тем, что мостик размыкается только после перехода в тормозящее состояние. Распад АТФ происходит в результате полного цикла мостика, что обеспечивает механохимическое сопряжение.

Интегрирование модели в частных производных по механической координате в областях положительной и отрицательной силы мостика позволило

получить систему обыкновенных дифференциальных уравнений для полного числа тянущих (n) и тормозящих (m) мостиков:

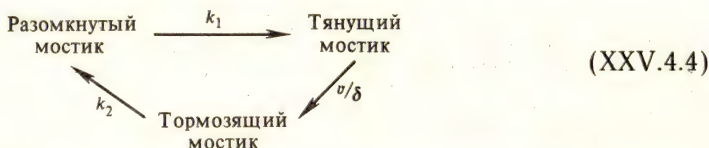
$$\dot{n} = k_1[\alpha(l) - n - m] - (v'/\delta)n; \quad (\text{XXV.4.1})$$

$$\dot{m} = (v'/\delta)n - k_2m; \quad (\text{XXV.4.2})$$

$$\dot{v}' = [1/(2N\tau)] [f(n - m) - p], \quad (\text{XXV.4.3})$$

где $\alpha(l)$ — число мостиков, способных замыкаться при длине 0,5 саркомера, равной l , в слое толщиной 0,5 саркомера, v' — скорость скольжения нитей, N — число саркомеров в волокне, τ — масса нагрузки, p — сила, развиваемая волокном, δ — длина зоны, в которой мостик развивает тянущую силу, f — сила мостика, k_1 — среднее значение константы скорости замыкания свободных мостиков, k_2 — константа скорости распада тормозящих мостиков.

Таким образом, механический цикл превращений мостика можно представить как цикл трех мономолекулярных переходов, одна из констант которого зависит от скорости укорочения мышцы:



Гидролиз АТФ оказывается связанным со скоростью укорочения мышцы, поскольку он считается следствием такого цикла.

При стационарном изотоническом сокращении около длины покоя, т. е. в области, где число мостиков не изменяется при скольжении нитей (см. рис. XXV.4), $\alpha(l) = \alpha_0$, где α_0 — максимальное число мостиков.

Стационарное решение системы (XXV.4.1) — (XXV.4.3), т. е. решение при условиях $\dot{n} = \dot{m} = \dot{v}' = 0$, дает

$$n_{\text{ст}} = [k_1(f\alpha_0 + p) + k_2p] / [f(2k_1 + k_2)]; \quad (\text{XXV.4.5})$$

$$m_{\text{ст}} = k_1(f\alpha_0 - p) / [f(2k_1 + k_2)];$$

$$v'_{\text{ст}} = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \frac{k_2\delta(f\alpha_0 - p)}{p + [k_1/(k_1 + k_2)]f\alpha_0}.$$

Выражение для стационарной скорости укорочения саркомера совпадает с уравнением Хилла (XXV.2.1). Это видно, если это уравнение переписать в виде

$$v' = b(p_0 - p)/(p + a).$$

При этом константы уравнения Хилла выражаются через параметры цикла мостиков

$$p_0 = f\alpha_0; \quad a = [k_1/(k_1 + k_2)]p_0;$$

$$b = k_1k_2\delta/(k_1 + k_2) = (a/p_0)v'_{\text{ст}}^{\text{max}}. \quad (\text{XXV.4.6})$$

Таким образом, единственной внутренней нагрузкой, препятствующей укорочению, в этой модели является сила, развиваемая тормозящими мостиками, число которых, как видно из (XXV.4.5), увеличивается с увеличением скорости сокращения мышцы. Следовательно, вязкость мышцы в модели определяется кинетическими и механическими свойствами мостиков, сила которых зависит только от координаты.

Стационарная скорость энергопродукции dE/dt определяется как произведение стационарного числа элементарных циклов в единицу времени на энергию, выделяющуюся в ходе каждого цикла (ϵ). Величина ϵ предполагается

постоянной и равной энергии гидролиза одной молекулы АТФ. Поэтому, как видно из цикла (XXV.4.4) и соотношений (XXV.4.5),

$$dE/dt = \varepsilon k_2 m_{\text{CT}} = \varepsilon k_2 k_1 (f\alpha_0 - p) / [(2k_1 + k_2)] = \text{const} (p_0 - p). \quad (\text{XXV.4.7})$$

Таким образом, скорость энергопродукции мышцы при сокращении с укорочением должна быть больше, чем в изометрическом режиме, что согласуется со свойствами мышцы. Зависимость $\dot{E}(p)$ может количественно совпадать с экспериментальными данными (см. рис. XXV.1, II) для $p > 0,5p_0$, если в (XXV.4.7) считать

$$\varepsilon / (f\delta) = (2k_1 + k_2) / (k_1 + k_2).$$

Теоретическая кривая в этом случае совпадает с прямой линией на рис. XXV.1, II. Однако при больших скоростях укорочения dE/dt нелинейно зависит от p и оказывается меньше величин, предсказываемых моделью.

Соотношения (XXV.4.6) позволили провести приблизительную оценку параметров элементарного цикла. Для портняжной мышцы лягушки $p_0 = 3 \cdot 10^5$ Н/м²; $a/p_0 = 0,25$; $v_{\text{CT}}^{\text{max}} = 1,5 \cdot 10^{-6}$ м/с. Считая, что $\alpha_0 = 10^{17}$, энергия гидролиза одной молекулы АТФ $\sim 3 \cdot 10^{-20}$ Дж, и приняв, что значение положительной работы в цикле $f\delta \approx \varepsilon$, получаем: $f = p_0/\alpha_0 = 3 \cdot 10^{-12}$ Н, $\delta = 10^{-8}$ м, $k_1 = 50$ с⁻¹, $k_2 = 150$ с⁻¹.

Эта модель позволяет также описывать нестационарные режимы сокращения с постоянной времени более 5 мс, т. е. происходящие в обычных физиологических режимах.

Сопоставление биохимических данных со свойствами механического [см. (XXV.4.4)] цикла мостика позволяет предположить, что разомкнутый мостик представляет смесь миозинсубстратных и миозинпродуктных состояний, а замкнутый — смесь разных актомиозинпродуктных состояний. Некоторые заключения о механических и кинетических свойствах разных промежуточных состояний актомиозина в мышце и их роли в элементарном цикле можно сделать из исследований свойств замкнутого состояния.

Механохимия замкнутого состояния. Анализ изменений силы на малых временах (см. рис. XXV.2), когда мостики не успевают размыкаться и замыкаться, привел к предположению, что при обычных режимах сокращения на стадии замкнутого мостика существует не менее двух механически различных состояний, которые находятся в равновесии друг с другом. Упругие свойства мостиков в этих состояниях подобны свойствам идеальной пружины (их механическая энергия пропорциональна квадрату растяжения), а минимумы потенциальной энергии (G^0) различаются по величине и имеют разную механическую координату. Первоначально эта гипотеза была сформулирована А. Хаксли и Р. Симмонсом, а затем более подробно разработана Т. Хиллом.

На рис. XXV.6 показана схема, иллюстрирующая изменения силы при быстром изменении длины и появление промежуточного плато силы при ее восстановлении как следствие наличия двух таких состояний. В первое состояние мостик попадает сразу после замыкания, а размыкаться может только второе состояние. Свободные энергии мостика в этих состояниях $G_1(x)$ и $G_2(x)$ зависят от механической деформации мостика в структуре саркомера:

$$G_1(x) = G_1^0 + K(x-h)^2/2; \quad G_2(x) = G_2^0 + Kx^2/2; \quad (\text{XXV.4.8})$$

здесь K — жесткость мостика (для простоты предполагают одинаковой в обоих состояниях), h — расстояние по оси x между минимальными положениями $G_1(x)$ и $G_2(x)$, т. е. различие в растяжении упругого элемента в рассматриваемых состояниях.

Сила, развиваемая мостиком в каждом состоянии, равна производной его свободной энергии по механической координате. Поэтому

$$f_1(x) = K(x - h); f_2(x) = Kx, \quad (\text{XXV.4.9})$$

где f_1 и f_2 — силы, развиваемые мостиком в 1-м и 2-м состояниях. Средняя по времени сила мостика

$$\varphi(x) = f_1(x)n_1(x) + f_2(x)n_2(x), \quad (\text{XXV.4.10})$$

где n_1 и n_2 — вероятности 1-го и 2-го состояний мостика. На рассматриваемом времени мостик может находиться только в одном из этих двух состояний. Поэтому $n_1 + n_2 = 1$. При установившемся равновесии

$$n_2(x)/n_1(x) = k_+(x)/k_-(x) = \exp\{-[G_2(x) - G_1(x)]/(k_B T)\}, \quad (\text{XXV.4.11})$$

где $k_+(x)$ и $k_-(x)$ — константы скоростей переходов из 1-го во 2-е состояние и обратно.

Согласно (XXV.4.8), изменение свободной энергии при переходе из 1-го состояния во 2-е составляет

$$G_2(x) - G_1(x) = G_2^0 - G_1^0 + Kh(x - 0,5h). \quad (\text{XXV.4.12})$$

Эта величина отличается от изменений свободной энергии в растворимых актомиозиновых системах при соответствующем биохимическом переходе ($G_2^0 - G_1^0$) в связи с тем, что механическая энергия белкового комплекса изменяется при этом переходе на величину работы по растяжению пружины на длину h .

В модели предполагается, что в изометрическом сокращении мостики замкнуты только при координате $x = x_0$, где свободные энергии обоих состояний равны [$G_1(x_0) = G_2(x_0)$]. Поэтому, согласно (XXV.4.11), $n_1 = n_2 = 0,5$. Тогда из (XXV.4.9) и (XXV.4.10) следует, что сила мостика при изометрическом сокращении равна

$$\varphi(x_0) = K(x_0 - 0,5h). \quad (\text{XXV.4.13})$$

Кроме того, согласно (XXV.4.12),

$$G_1^0 - G_2^0 = Kh(x_0 - 0,5h). \quad (\text{XXV.4.14})$$

При изменении длины волокна координата всех мостиков изменится на величину y , равную изменению длины 0,5 саркомера. Если изменение длины происходит очень быстро, то распределение мостиков по состояниям не изменится. Поэтому сразу после изменения длины (в момент времени $t=0$) сила $\varphi(x_0 + y, t)$ будет равна

$$\varphi(x_0 + y, 0) = K(y + x_0 - 0,5h). \quad (\text{XXV.4.15})$$

Таким образом, сразу после изменения длины сила линейно зависит от y , что соответствует зависимости p_1 (см. рис. XXV.2.II). Сила упадет до нуля ($\varphi(x_0 + y, 0) = 0$) при укорочении 0,5 саркомера на величину $y = y_0 = -(x_0 - 0,5h)$, т. е. на величину среднего растяжения мостика. При таком укорочении $x = h/2$. Видно, что зависимость значения этой силы от y описывается прямой, проходящей параллельно прямым f_1 и f_2 и расположенной посередине между ними (рис. XXV.6). Величину y_0 можно оценить экстраполяцией экспериментальной зависимости $p_1(y)$ (пунктир на рис. XXV.2.II). Такая оценка дает $y_0 = -8$ нм.

В то же время если после изменения длины установилось равновесное распределение мостиков по состояниям при новой координате $x = x_0 + y$ согласно соотношениям (XXV.4.11) и (XXV.4.12), то зависимость силы от величины изменения длины уже не будет линейна. При достаточно больших растяжениях ($G_1(x) < G_2(x)$) мостики будут в основном в 1-м состоянии и сила

будет определяться прямой f_1 . При достаточно больших укорочениях [$G_1(x) > G_2(x)$] мостики будут в основном во 2-м состоянии и сила будет определяться прямой f_2 . В случае промежуточных величин изменений длины $\varphi(x_0 + y)$ будет, согласно (XXV.4.10), описываться кривой, переходящей с прямой f_1 на прямую f_2 через точку, определяющую изометрическую силу. Вид

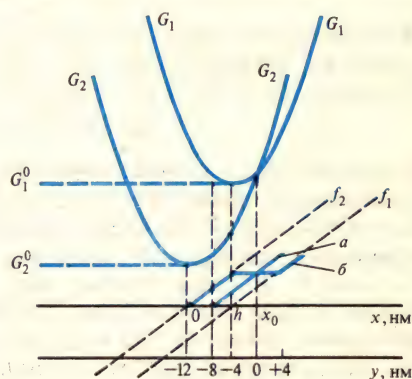


Рис. XXV.6. Объяснение изменения силы мышцы во время быстрого изменения ее длины:

G_1 , G_2 и f_1 , f_2 — свободные энергии и силы мостика в 1-м и 2-м состояниях; x — механическая координата мостика, y — изменение длины $1/2$ саркомера за счет скольжения нитей при изменении длины мышцы (та же величина, что на рис. XXV.2); синими линиями выделены средние силы мостика во время быстрого укорочения (a) и после установления равновесия между 1-м и 2-м состояниями ($б$); остальные пояснения см. в тексте

$\varphi(y)$ может соответствовать зависимости $p_2(y)$ (см. рис. XXV.2, II) при определенных значениях параметров. Эти параметры можно определить из кинетики процесса быстрого восстановления силы, которая в модели описывается одним экспоненциальным процессом с константой скорости.

$$r(x) = k_+(x) + k_-(x). \quad (\text{XXV.4.16})$$

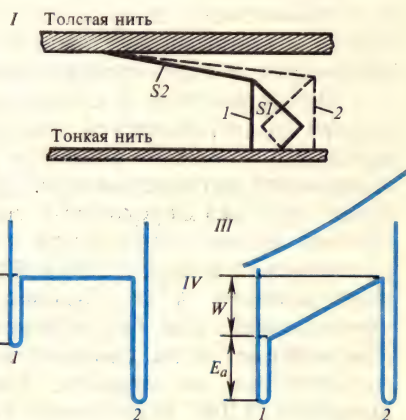


Рис. XXV.7. Влияние изменения механической энергии мостика на кинетику перехода между 1-м (I) и 2-м (2) состояниями (по А. Лоуву, 1982):

I — упрощенная схема модели Хаксли и Симмонса для двух состояний замкнутого мостика ($S1$ — субфрагмент-1, $S2$ — субфрагмент-2); II — энергетический профиль реакции в отсутствие связи субфрагмента-1 с толстой нитью, например в растворе актосубфрагмента-1 (E_a — энергия активации перехода из 1-го во 2-е состояние); III — изменение энергии упругого элемента при переходе; IV — энергетический профиль реакции для мостика, показанного на схеме I (сумма энергий, показанных на II и III); видно, что энергия активации перехода из 1-го во 2-е состояние увеличивается на величину работы W , необходимой для растяжения упругого элемента, и равна $E_a + W$

Для объяснения экспериментальной зависимости $r(y)$ (см. рис. XXV.2, III) А. Хаксли и Р. Симмонс предложили модель мостика, в которой два замкнутых состояния возникают при взаимодействии разных участков субфрагмента-1 и актина (рис. XXV.7, I). Субфрагмент-1 предполагают абсолютно жестким, а конфигурацию актомиозиновой связи — жестко фиксированной в каждом состоянии. Поэтому переход из 1-го состояния во 2-е сопровождается растяжением последовательного упругого элемента мостика (возможно, субфрагмента-2).

В связи с этим такой переход возможен только после растяжения этого элемента в результате тепловых флуктуаций. Следовательно, энергия растяжения упругого элемента добавляется к энергии активации этого перехода (рис. XXV.7, II—IV).

Для такой модели с учетом (XXV.4.11), (XXV.4.12) и (XXV.4.14)

$$k_+(y) = k - \exp[-yKh/(k_B T)] \quad (\text{XXV.4.17})$$

В то же время переход из 2-го состояния в 1-е не сопровождается растяжением упругого элемента при $x > 0,5h$, т. е. во всей экспериментальной области. Поэтому из (XXV.4.16) следует

$$r(y) = k - \{1 + \exp[-yKh/(k_B T)]\} \quad (\text{XXV.4.18})$$

что согласуется с экспериментальными данными, которые могут быть аппроксимированы зависимостью $r = 0,2 [1 + \exp(-0,5 y)]$ (см. рис. XXV.2, III), если $Kh = 0,5 k_B T$. Поэтому, согласно (XXV.4.14), учитывая, что $x_0 - 0,5h = 8$ нм, изменения свободной энергии биохимического перехода равны $G_2^0 - G_1^0 = -4k_B T$. В этом случае вид равновесной зависимости $\phi(x_0 + y)$ наиболее близок к $p_2(y)$ при $h = 8$ нм. Тогда средняя сила мостика в изометрическом сокращении, согласно (XXV.4.13) и (XXV.4.14), составит $(G_1^0 - G_2^0)/h = 2 \cdot 10^{-12}$ Н, что недостаточно для получения значения изометрической силы мышцы. Поэтому предполагают, что на стадии замкнутого мостика существует два-три аналогичных перехода с большим суммарным высвобождением свободной энергии и меньшим «шагом» на каждой стадии. В таких переходах сила генерируется благодаря тому, что переход в состояние с более низкой энергией происходит при значении механической координаты, отличающейся от координаты минимальной энергии этого состояния. В результате возникает деформированное состояние мостика. Энергия его упругой деформации может превращаться в механическую работу, если мышце позволить укорачиваться.

Возможность существования нескольких промежуточных состояний замкнутого мостика с последовательно уменьшающейся свободной энергией согласуется с данными биохимической кинетики: прочность актомиозиновой связи возрастает в ходе превращения АТФ в актомиозиновый цикл.

Представление о существовании замкнутых мостиков с разной конфигурацией поддерживается опытами по исследованию процессов на замкнутом мостике с помощью аналогов субстрата и продуктов реакции. Для таких исследований активированную сократительную систему отмывают от АТФ, вследствие чего она переходит в состояние, называемое ригорным, в котором длительное время сохраняется изометрическая сила, сравнимая по значению с развиваемой в присутствии АТФ. Добавление к таким мышцам негидролизуемого аналога АТФ — аденилил-имидодифосфата — приводит к обратимому уменьшению силы без изменения жесткости, т. е. без размыкания мостиков. Уменьшение силы соответствует удлинению мостиков примерно на 2 нм. Аналогичные, но меньшие изменения механических свойств ригорных мышц вызывает АДФ. В ригорной мышце замкнутые мостики наклонены под углом 45° к тонкой нити, а в релаксированной — мостики расположены перпендикулярно осям нитей. Связывание аденилил-имидодифосфата, а также неорганического пирофосфата вызывает увеличение угла наклона мостиков. По-видимому, при связывании аналогов субстрата в активном центре происходит обратимая механохимическая реакция (в соответствии с XXV.1.5) обнаружено увеличение связывания аденилил-имидодифосфата при растяжении ригорной мышцы).

Для обеспечения высокой эффективности работы мышцы требуется, чтобы полный ферментативный процесс гидролиза АТФ не происходил с заметной

скоростью при фиксированной механической координате мостика, так как это приводило бы к не связанной с совершением работы трате АТФ. Мостик должен замыкаться в положении, где будет развиваться сила, а размыкаться — после окончания ферментативного процесса и после совершения работы при скольжении нитей, т. е. при другой механической координате. Таким образом, лимитирующая стадия реакции гидролиза АТФ должна зависеть от механической координаты мостика. Видимо, это в значительной мере обеспечивается наличием нескольких замкнутых состояний, различающихся по величине минимума потенциальной энергии и соответствующей ему механической координате. Из рис. XXV.6 видно, что в области, где 1-е состояние развивает значительную силу, 2-е — отсутствует, поскольку оно термодинамически невыгодно.

При подходящем выборе зависимости кинетических и термодинамических параметров АТФазной реакции от механической координаты мостиков возможно построение математических моделей мышцы, которые обладают высокой термодинамической эффективностью и позволяют описывать механику сокращения (Т. Хилл).

Представления о принципах работы механохимического преобразователя в мышце можно кратко сформулировать следующим образом. Фермент в ходе катализа проходит через ряд состояний с различными механическими свойствами. Энергетическое сопряжение осуществляется благодаря специальной зависимости скоростей переходов между этими состояниями от механической координаты фермента в структуре саркомера. Таким образом, свободная энергия гидролиза АТФ преобразуется в энергию упругой деформации молекул фермента, которая затем может быть использована для совершения механической работы. Однако механизмы молекулярных перестроек на разных стадиях механохимического цикла фермента, а также энергетические и кинетические свойства отдельных состояний актомиозина в мышце остаются предметом дискуссий.

Наиболее разработаны представления о механизме преобразования энергии в рамках традиционной в биохимии точки зрения, согласно которой в ходе ферментативного катализа неравновесным является только распределение молекул фермента по конечному числу состояний, переходы между которыми происходят мгновенно по сравнению с их временем жизни; какие-либо медленные релаксационные процессы в молекулах белка не рассматриваются. Известные свойства мышцы могут быть термодинамически непротиворечиво описаны при таких предположениях. Однако такая ситуация может не выполняться при ферментативном катализе (см. гл. XIV) и при мышечном сокращении.

В мышечном сокращении медленные релаксационные процессы могли бы возникать также при деформации фермента вследствие скольжения нитей из-за наличия вязкоупругих свойств белков. Это означает, что сила, развиваемая мостиком в данном биохимическом состоянии, и кинетика переходов между состояниями должны зависеть не только от механической координаты мостика, но и от ее производных по времени. К настоящему времени не найдено достаточных экспериментальных доказательств для такого заключения.



§ 1. Общие закономерности рецепции

Существование высокоорганизованного многоклеточного организма животного и человека невозможно без постоянного обмена информацией, командами и сигналами между клетками. Не менее важна для организма и информация об окружающей среде, химические компоненты которой организм оценивает с помощью систем хеморецепции (обоняние и вкус). Эта стройная, тонко отлаженная система обуславливает взаимодействие клеточных систем, позволяющее многоклеточному организму функционировать как единое целое.

Подавляющее большинство сигналов, которыми обмениваются клетки в организме, связано с переносом «сигнальных» молекул и имеет химическую природу: это гормоны, нейромедиаторы, регуляторные пептиды. Во всех случаях, будь то рецепция внутриорганизменных химических сигналов или хеморецепция, на 1-м этапе происходит доставка сигнальной молекулы к специальным клеточным структурам, воспринимающим сигнал,—к рецепторам.

На 2-м этапе должно произойти непосредственное взаимодействие этой молекулы с рецептором и ее «узнавание». Воспринятый таким образом сигнал затем преобразуется в результате развития соответствующих внутриклеточных молекулярных процессов (например, за счет включения системы циклических нуклеотидов, открытия ионных каналов и т. д.). Наконец, на завершающем этапе происходят процессы, ведущие к появлению функциональных изменений: генерация нервных импульсов (например, в случае хеморецепции) либо выработка секретируемых продуктов.

Таким образом, переработка сигнальной информации в процессах рецепции происходит по общей схеме: доставка «сигнальной» молекулы→связывание-узнавание→преобразование сигнала→функциональные изменения.

Сигнальные молекулы, воспринимаемые клетками, вырабатываются либо внутри того же организма в других специализированных клетках, либо попадают извне. Расстояния, преодолеваемые сигнальными молекулами в организме или по пути к нему, могут измеряться метрами и даже километрами. Перемещение на такие большие расстояния обусловлено не пассивной диффузией, а путем различных видов конвекции, например за счет движения крови, потоков воздуха. Однако вблизи клетки, на расстояниях порядка микрометра от ее поверхности, молекулы достигают рецепторных мембранных структур уже путем диффузии. Г. Адам и М. Дельбрюк (1968) показали, что существование рецепторных структур на мембране клетки при определенных условиях резко ускоряет взаимодействие сигнальной молекулы с рецептором. Было рассчитано среднее время диффузии (τ) молекулы к мишени радиуса a в области пространства радиуса b и размерности i , если коэффициент диффузии молекулы $D^{(i)}$. Оказалось, что τ^i есть функция от отношения b/a , зависящая от размерности пространства:

$$\tau^{(i)} = (b^2/D^{(i)})f^{(i)}(b/a). \quad (\text{XXVI.1.1})$$

Так, в одномерном пространстве ($i=1$)

$$\tau^{(1)} = b^2/D^{(1)}(1-a/b)^2/3. \quad (\text{XXVI.1.2})$$

При $b \gg a$

$$\tau^{(1)} = b^2/(3D^{(1)}). \quad (\text{XXVI.1.3})$$

В двумерном пространстве при $b \gg a$

$$\tau^{(2)} = [b^2/(2D^{(2)})] \ln(b/a), \quad (\text{XXVI.1.4})$$

а в трехмерном при $b \gg a$

$$\tau^{(3)} = b^3/(3aD^{(3)}). \quad (\text{XXVI.1.5})$$

Рецепторные структуры на мембране, на которые попадают сигнальные молекулы, диффундирующие затем непосредственно к рецептору, способствуют ускорению взаимодействия этих молекул с рецептором. На рис. XXVI.1, I показан случай обычной трехмерной диффузии в большой сфере радиуса b к малой концентрической сфере радиуса a . На рис. XXVI.1, II дана иллюстрация другого случая, когда частица, двигаясь в цилиндре высоты b и радиуса b , попадает в экваториальную «рецепторную» мембранную плоскость и уже по ней диффундирует к рецептору — диску радиуса a . В этих условиях обычная трехмерная диффузия заменяется двухстадийной комбинированной диффузией: вначале сигнальная молекула за счет трехмерной диффузии попадает в область, занятую рецепторной мембранной структурой, а затем диффундирует по мембране согласно уравнениям двумерной диффузии. Расчеты показывают, что соотношение времен обычной трехмерной $\tau^{(3)}$ [см. (XXVI.1.5)] и такой комбинированной $\tau^{(3,2)}$ диффузии зависит от отношений b/a и $D^{(2)}/D^{(3)}$.

Для $10^2 < b/a < 10^4$ и $10^3 < D^{(2)}/D^{(3)} < 1$ можно использовать приближенную формулу

$$\tau^{(3,2)}/\tau^{(3)} \approx (a/b)(D^{(3)}/D^{(2)})10. \quad (\text{XXVI.1.6})$$

Графики зависимостей $\tau^{(3,2)}/\tau^{(3)}$ от b/a и $D^{(2)}/D^{(3)}$ даны на рис. XXVI.1, III. На нем незакрашенная область соответствует $\tau^{(3,2)}/\tau^{(3)} < 1$. Вполне очевидны преимущества двухстадийной диффузии перед одностадийной трехмерной в случае больших b/a и малых $D^{(2)}/D^{(3)}$. Таким образом, существование рецепторных областей на мембране способствует ускорению взаимодействия сигнальных молекул с рецепторами.

Следующим этапом рецепции является связывание молекулы лиганда — гормона, нейромедиатора или пахучего вещества — с рецептором, ведущее к восприятию сигнала. В результате взаимодействия лиганда с рецептором образуется лиганд-рецепторный комплекс, формально аналогичный фермент-субстратному комплексу (см. гл. XIV):



Здесь L — лиганд, R — рецептор, K — константа сродства ($K=1/K_{\text{дисс}}$, где $K_{\text{дисс}}$ — равновесная константа диссоциации).

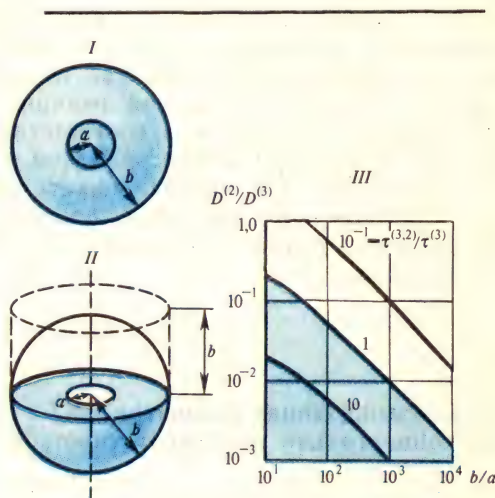


Рис. XXVI.1. К выводу формулы (XXVI.1.6)
Пояснение см. в тексте

Константы сродства гормон-рецепторных комплексов лежат в интервале 10^8 — 10^{11}M^{-1} , что намного больше сродства фермент-субстратных комплексов. Собственно «узнавание» соответствующего лиганда заключается в связывании его специфическим рецептором; чуждое для этого рецептора вещество, не имеющее к нему сродства, не связывается и тем самым остается «неузнаваемым».

Рассмотрим наиболее общую ситуацию, когда n лигандов взаимодействуют с m классами участков связывания (рецепторы), причем в рассматриваемой системе отсутствуют какие-либо другие вещества, способные взаимодействовать как с этими лигандами, так и с участками связывания. Помимо этого примем, что: 1) между лигандом и связывающим участком возможна только одна обратимая реакция; 2) все реагирующие компоненты системы одновалентны, а образующийся комплекс не выходит из реакции и не включается в другие реакции; 3) каждая реакция связывания независимо от остальных приходит к равновесию в соответствии с кинетикой реакций второго порядка; 4) нет кооперативных эффектов и аллостерического связывания.

Поскольку i -й лиганд может существовать в состоянии, связанном с j -м участком, $-B_{ij}$, (от англ. *bound* — связанный) и в свободной форме $-F_i$ (от англ. *free* — свободный), то общая концентрация i -го лиганда ($[L_i]$) будет равна

$$[L_i] = [F_i] + \sum_{j=1}^m [B_{ij}], \quad i = 1, \dots, n. \quad (\text{XXVI.1.8})$$

Аналогично, общая концентрация j -х участков связывания ($[R_j]$) складывается из концентрации незанятых участков ($[r_j]$) и участков, связавших лиганды:

$$[R_j] = [r_j] + \sum_{i=1}^n [B_{ij}], \quad j = 1, \dots, m. \quad (\text{XXVI.1.9})$$

Константа сродства (K_{ij}) при равновесии ($F_i + r_j \rightleftharpoons B_{ij}$) равна

$$K_{ij} = \frac{[B_{ij}]}{[F_i][r_j]}, \quad i = 1, \dots, n; \quad j = 1, \dots, m. \quad (\text{XXVI.1.10})$$

Подставив значения для $[B_{ij}]$ из уравнения (XXVI.1.10) в уравнения (XXVI.1.8) и (XXVI.1.9), получим

$$[L_i] = [F_i] + \sum_{j=1}^m K_{ij}[r_j][F_i], \quad i = 1, \dots, n, \quad (\text{XXVI.1.11})$$

$$\text{и } [R_j] = [r_j] + \sum_{i=1}^n K_{ij}[r_j][F_i], \quad j = 1, \dots, m. \quad (\text{XXVI.1.12})$$

Найдем из уравнения (XXVI.1.12)

$$[r_j] = [R_j] \left(1 + \sum_{i=1}^n K_{ij}[F_i] \right), \quad j = 1, \dots, m, \quad (\text{XXVI.1.13})$$

и, подставив в (XXVI.1.11), получаем

$$[L_i] = [F_i] + \sum_{j=1}^m K_{ij}[R_j][F_i] \left(1 + \sum_{a=1}^n K_{aj}[F_a] \right), \quad (i = 1, \dots, n) \quad (\text{XXVI.1.14})$$

Это уравнение с учетом (XXVI.1.8) можно преобразовать так, чтобы охарактеризовать отношение (k_i) концентраций связанного и свободного i -го лиганда (Н. А. Feldman, 1972):

$$k_i = \sum_{j=1}^m [B_{ij}] / [F_i] = [L_i] / [F_i] - 1 = \sum_{j=1}^m K_{ij} [R_j] / \left(1 + \sum_{a=1}^n K_{aj} [F_a] \right), \quad i=1, \dots, n. \quad (\text{XXVI.1.15})$$

Рассмотрим ряд характерных случаев.

1. Один лиганд ($i=1$) и один участок связывания ($j=1$). Здесь можно отбросить подстрочные индексы. Из (XXVI.1.15)

$$k = K[R] / (1 + K[F]), \quad (\text{XXVI.1.16})$$

а так как $[F] = [B]/k$, то

$$k = [B]/[F] = K[R] - K[B] \quad (\text{уравнение Скэтчарда}). \quad (\text{XXVI.1.17})$$

График этого уравнения в координатах ($[B]/[F]$, $[B]$) представляет собой прямую. Экспериментальные данные по связыванию радиоактивных лигандов часто представляют именно в координатах Скэтчарда, полагая, что $[L] \gg [R]$, т. е. $[F] \approx [L]$. Параметры равновесного связывания получают, продолжая прямую до пересечения с осями: на оси абсцисс отсекается отрезок, равный $[R]$, на оси ординат — $K[R]$, тангенс угла наклона соответствует $-K$.

Однако часто связывание одного лиганда не описывается прямой в координатах Скэтчарда. В отсутствие отрицательной кооперативности это бывает обусловлено наличием более одного участка связывания.

2. Один лиганд ($i=1$) и два участка связывания ($j=2$). Способом, аналогичным предыдущему, можно преобразовать уравнение (XXVI.1.15) для случая $i=1$, $j=2$:

$$K_{11}K_{12}[B]^2 + (K_{11} + K_{12})k[B] + k^2 - K_{11}K_{12}([R_1] + [R_2])[B] - (K_{11}[R_1] + K_{12}[R_2])k = 0. \quad (\text{XXVI.1.18})$$

Графиком этого уравнения в координатах (k , $[B]$) является гипербола, продолжения которой отсекают на оси абсцисс отрезок $[R_1] + [R_2]$, на оси ординат — отрезок $K_{11}[R_1] + K_{12}[R_2]$. Асимптотами гиперболы являются прямые $k = -K_{11}([B] - [R_1])$ и $k = -K_{12}([B] - [R_2])$, отсекающие на оси ординат отрезки $k_{11}[R_1]$ и $K_{12}[R_2]$, а на оси абсцисс — $[R_1]$ и $[R_2]$ (рис. XXVI.2). Эти особенности позволяют провести анализ экспериментальных данных и приблизительно (графически) определить параметры равновесного связывания.

3. Два лиганда ($i=2$) и один участок связывания ($j=1$). Случай, часто встречающийся в практике, когда есть один меченый лиганд, специфически связывающийся с одним типом рецепторов, и возникает необходимость определить характеристики связывания другого, но уже немеченого лиганда.

Из (XXVI.1.14) и (XXVI.1.8) получаем

$$\sum_{j=1}^m [B_{ij}] = \sum_{j=1}^m K_{ij} [R_j] [F_i] / \left(1 + \sum_{a=1}^n K_{aj} [F_a] \right), \quad i=1, \dots, n. \quad (\text{XXVI.1.19})$$

При $i=1$ и $j=1$ для лиганда I (обычно радиоактивного; помечен звездочкой) из (XXVI.1.19) следует

$$[B^*] = K_1 [R] [F^*] / (1 + K_1 [F^*] + K_2 [F_2]). \quad (\text{XXV.1.20})$$

Если концентрацию меченого лиганда 1 поддерживать постоянной и изменять концентрацию немеченого лиганда 2, то с увеличением $[F_2]$ будет уменьшаться $[B_1^*]$ из-за «вытеснения» его немеченым конкурентом. Рассмотрим условия, когда $[L_2] \gg [R]$ (рис. XXVI.3). В отсутствие лиганда 2, т. е. когда $[F_2] \approx [L_2] = 0$, связывание меченого лиганда 1 максимально:

$$[B_1^*]_0 = K_1[R][F_1^*] / (1 + K_1[F_1^*]). \quad (\text{XXVI.1.21})$$

Можно найти такую эффективную концентрацию лиганда 2 ($EC_{50} = [F_2]' \approx \approx [L_2]'$), которая на 50% «вытесняет» меченый лиганд 1 (рис. XXVI.3), т. е.

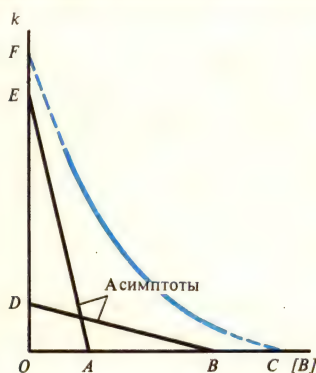


Рис. XXVI.2. График связывания одного лиганда с двумя участками (в координатах k , $[B]$):

$$OC = [R_1] + [R_2]; \quad OF = K_{11}[R_1] + K_{12}[R_2]; \quad OA = [R_1]; \quad OB = [R_2]; \\ OD = K_{12}[R_2]; \quad OE = K_{11}[R_1]$$

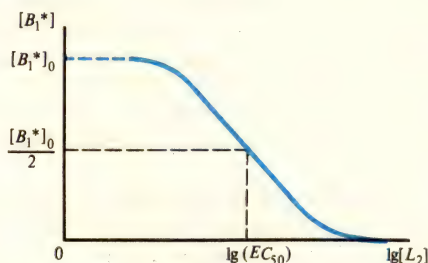


Рис. XXVI.3. «Вытеснение» лигандом 2 (L_2) меченого лиганда 1: $[L_2] \gg [R]$ (пояснение см. в тексте)

$[B_1^*]$ становится равной $1/2 [B_1^*]_0$. Легко рассчитать из (XXVI.1.20) и (XXVI.1.21), что в этом случае

$$K_2 = (1 + K_1[F_1^*]) / (EC_{50}). \quad (\text{XXVI.1.22})$$

4. Число лигандов и участков связывания больше 1 ($i > 1, j > 1$). Этот случай требует числового решения уравнений (XXVI.1.15), (XXVI.1.16) или (XXVI.1.20), позволяющего найти оптимальные значения j , формы теоретических кривых, а также многие параметры связывания, в том числе и вклад данных j -х участков в общем связывании лиганда. Этим методом была получена подробная информация о рецепторах катехоламинов (адреналин, норадреналин и их аналоги) и других гормонов, о взаимодействии этих рецепторов с регуляторными мембранными белками на начальных стадиях преобразования гормонального сигнала.

Этап преобразования сигнала, наступающий после связывания рецептором лиганда, подробнее изучен на молекулярном уровне в случае гормональной рецепции. Исследования этого этапа при хеморецепции только начаты. Разли-

чия в уровнях знаний о последующих стадиях рецепции обуславливают и раздельное рассмотрение рецепции гормонов, пахучих веществ и вкусовых веществ.

§ 2. Особенности гормональной рецепции

Большинство рецепторов к гормонам расположено в плазматической мембране клеток, которая первой соприкасается с внешней для клетки средой (кровь, меж-

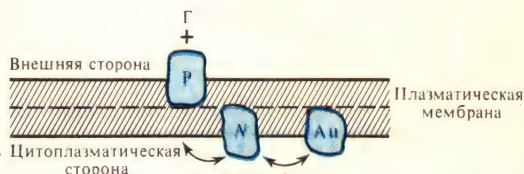


Рис. XXVI.4. Аденилатциклазный комплекс:

Г—гормон; Р—рецептор к гормону, N—N-белок, Ац—аденилатциклаза

клеточная жидкость). Исключение представляют, например, рецепторы стероидных гормонов, находящиеся внутри клетки.

Сигнал от многих пептидных гормонов и катехоламинов преобразуется в процессе активации мембранного фермента аденилатциклазы, катализирующей синтез регуляторного нуклеотида — циклического АМФ (цАМФ). В клетках эукариот цАМФ активирует цАМФ-зависимые протеинкиназы, которые специфически фосфорилируют функциональные или структурные белки. В результате активируется или ингибируется синтез определенных биомолекул, в том числе секретируемых клеткой, изменяются транспорт ионов, механическая активность клетки и др.

Преобразование сигнала гормона в сигнал цАМФ происходит в плазматической мембране в результате взаимодействия интегральных белков трех типов: рецептора, регуляторного N-белка и аденилатциклазы (рис. XXVI.4). N-белок в активном состоянии (в комплексе с ГТФ) влияет на активность аденилатциклазы. Однако перевести N-белок в активное состояние может лишь рецептор, связавший гормон. Поэтому для аденилатциклазной реакции необходимо попарное взаимодействие в мембране этих белков с образованием временных комплексов рецептор — N-белок и N-белок — аденилатциклаза (это было экспериментально доказано в конце 70-х — начале 80-х годов). Таким образом, фундаментальным и общим процессом в передаче сигнала гормона в клетку является взаимодействие рецепторов со специализированными белками внутри мембраны.

Рецепторы, N-белки и аденилатциклазы могут существовать в виде отдельных и часто независимых белков плазматической мембраны. Поэтому на характер и скорость их перемещения и взаимодействия будет оказывать существенное влияние структура мембраны и, в частности, ее липидного бислоя (см. гл. XV; XVI). Неслучайно скорость аденилатциклазной реакции, активируемой гормоном, существенно зависит от физического состояния липидов мембраны — среды, где происходит взаимодействие белков аденилатциклазного комплекса.

Движение рецепторов в плазматической мембране живой клетки может быть экспериментально обнаружено. Так, рецептор можно метить, присоединяя к нему флуоресцирующее соединение (см. § 2 гл. X). Мощная вспышка лазера

вызывает фотоокисление и «отбеливание» флуорофора (потеря им способности флуоресцировать) на небольшом участке клетки (радиусом 1—2 мкм). Затем происходит восстановление флуоресценции «отбеленного» участка. Процесс восстановления флуоресценции отражает «наплывание» в этот участок «неотбеленных» рецепторов, т. е. свидетельствует об их движении (рис. XXVI.5). По параметрам восстановления флуоресценции можно рассчитывать коэффициенты латеральной диффузии рецепторов.

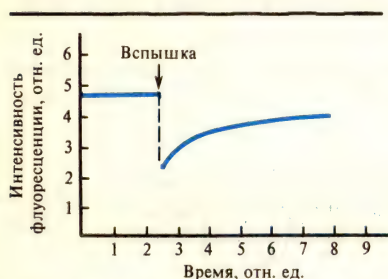


Рис. XXVI.5. Кинетика восстановления флуоресценции после «фотоотбеливания» участка клеточной мембраны

Связь коэффициента диффузии рецептора с восстановлением флуоресценции можно пояснить следующим образом. В одномерном случае пространственно-временные изменения концентрации (c) диффундирующего вещества определяются по второму закону Фика:

$$\partial c / \partial t = D \partial^2 c / \partial x^2, \quad (\text{XXVI.2.1})$$

где D — коэффициент диффузии, t — время, x — единственная координата диффузии.

Решение этого уравнения для начальных условий, когда при $t=0$ все вещество сконцентрировано (c_0) в начале координаты, будет

$$c/c_0 = (4\pi Dt)^{-1/2} \exp[-x^2/(4Dt)]. \quad (\text{XXVI.2.2})$$

Так как среднее значение пробега $\langle x \rangle$ диффундирующих частиц для любого t будет

$\langle x \rangle = 0$, то найдем дисперсию $\langle x^2 \rangle$. Выражение (XXVI.2.2) можно рассматривать как плотность распределения вероятности обнаружения диффундирующего вещества в точке x . Тогда

$$\langle x^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} x^2 (4\pi Dt)^{-1/2} \exp[-x^2/(4Dt)] dx. \quad (\text{XXVI.2.3})$$

Интеграл разбивается на два табличных, и для одномерного случая получаем

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \text{ или } D = \langle x^2 \rangle / (2t). \quad (\text{XXVI.2.4})$$

Для двумерного случая (движение в плоскости мембраны)

$$D = \langle x^2 \rangle / (4t), \quad (\text{XXVI.2.5})$$

а для трехмерного

$$D = \langle x^2 \rangle / (6t). \quad (\text{XXVI.2.6})$$

Используя формулу (XXVI.2.5) в несколько преобразованном виде (D. Axelrod et al., 1976), можно рассчитать D по данным «фотоотбеливания»:

$$D = [\omega^2 / (4\tau_{1/2})] \gamma, \quad (\text{XXVI.2.7})$$

где ω — радиус лазерного луча, уменьшенный в e^2 раз; $\tau_{1/2}$ — время полувосстановления флуоресценции; γ — величина, характерная для используемого лазерного луча и получаемая при точном решении уравнения двумерной диффузии (обычно около 1,3). Величины D для рецепторов оказываются порядка 10^{-11} — 10^{-9} см²/с. Полного восстановления флуоресценции меченых рецепторов на «отбеленном» участке не происходит (рис. XXVI.5), поэтому можно считать, что часть рецепторов «неподвижна».

Существенным фактором, определяющим подвижность рецепторов и взаимодействующих с ними белков (а тем самым и передачу гормонального сигнала в клетку), служит макроструктура мембраны. Мембранные белки образуют агрегаты, которые могут удерживаться цитоскелетом и подмембран-

ными структурами, в состав последних входят белки фодрин, спектрин или TW260/240. Таким образом, движение рецепторов осуществляется не в открытом липидном «море» мембраны, а между «островами» из неподвижных агрегатов белков. Движение белков в мембране осложняется также наличием липидов в фазе геля («твердые» липиды). Следовательно, на скорость передвижения будет оказывать существенное влияние доля площади мембраны (η), доступной для движения белков. Ясно, что при уменьшении η свободное передвижение белковых молекул на сколь угодно большие расстояния будет не только замедляться, но и при определенном значении ($\eta = \eta_{кр}$) вообще прекратится. Критическое соотношение между площадями поверхности, занимаемыми липидами и неподвижными агрегатами, при которой такое движение прекращается (величина $\eta_{кр}$), может быть рассчитано с использованием методов теории перколяции (от лат. *percolatio* — просачивание). Эта теория исследует связность макроскопического числа каких-либо элементов при условии, что связь каждого элемента со своими «соседями» носит случайный характер, но задается конкретным способом (А. Л. Эфрос, 1982). Продемонстрировано существование перколяционного порога для взаимодействия белков аденилатциклазного комплекса (А. С. Соболев, 1984).

Кинетика взаимодействия белков в мембране отличается от обычной кинетики реакций в объеме. Если считать, что взаимодействие двух частиц определяется только их диффузией в среде, то стационарная скорость (V) диффузионно-контролируемой реакции $A + B \rightarrow AB$ будет равна

$$v = c_A / \tau_A + c_B / \tau_B, \quad (\text{XXVI.2.8})$$

где c_A и c_B — концентрации частиц A и B в молях на единицу объема или единицу площади; τ_A — среднее время диффузии, за которое частица A достигнет неподвижной частицы B ; τ_B — то же, для подвижной частицы B .

Все пространство, где происходит реакция, можно разбить на ячейки радиуса b , в центре которых находятся «ловушки» радиуса a (см. рис. XXVI.1.1). Частицы (допустим, типа A) свободно диффундируют в ячейке, пока не попадут в ловушку радиуса a , где они взаимодействуют с частицей типа B . Размер ячейки радиуса b можно определить исходя из числа реагирующих частиц в единице объема или единице площади: N_c , где N — число Авогадро. Тогда в трехмерном случае $1/N_{c_B} = 4/3 \pi b_B^3$ — величина ячейки с «ловушкой» в виде частицы B ; $1/(N_{c_A} = 4/3 \pi b_A^3$ — величина ячейки с «ловушкой» в виде частицы A . Отсюда, подставляя в (XXVI.1.5) величины b_A^3 и b_B^3 найдем

$$\tau_A^{(3)} = (4\pi N a c_B D_A)^{-1}; \quad \tau_B^{(3)} = (4\pi N a c_A D_B)^{-1}, \quad (\text{XXVI.2.9})$$

а подставляя (XXVI.2.9) в (XXVI.2.8), получаем

$$v = 4\pi N a (D_A + D_B) c_A c_B. \quad (\text{XXVI.2.10})$$

В двумерном случае соответственно имеем размеры «ловушек

$$1/(N_{c_B}) = \pi b_B^2; \quad 1/(N_{c_A}) = \pi b_A^2. \quad (\text{XXVI.2.11})$$

Решая (XXVI.2.11) относительно b , находим величины τ в выражении (XXVI.1.4), а затем и v в (XXVI.2.8) (Sh. Hardt, 1979):

$$v = 2\pi N \{ D_A / \ln[(\pi N c_B)^{-1/2} / a] + D_B / \ln[(\pi N c_A)^{-1/2} / a] \} c_A c_B. \quad (\text{XXVI.2.12})$$

Выражение (XXVI.2.10) — известная формула Смолуховского. Величина $4\pi Na(D_A + D_B)$, стоящая перед произведением $c_A c_B$, представляют собой константу скорости реакции второго порядка в объеме. Очевидно, зависимость скорости реакции от концентраций c_A и c_B соответствует здесь зависимости, характерной для реакций второго порядка.

В двумерном случае (XXVI.2.12) оказывается, что скорость реакции более сложным образом зависит от концентраций реагентов. С увеличением концентраций c_A и c_B будет увеличиваться значение множителя, стоящего перед $c_A c_B$ в (XXVI.2.12), а с уменьшением концентраций, наоборот, снижаться.

Следовательно, в двумерном случае скорость реакции может дополнительно регулироваться концентрациями реагирующих частиц.

Такая регуляция осуществляется в клетке *in vivo*, в частности, за счет уменьшения или увеличения числа рецепторов, реагирующих с лигандами, это так называемая *down*- и *up*-регуляция. В результате значительно изменяется интенсивность внутриклеточной реакции на соответствующий гормон, взаимодействующий с рецептором данного типа.

§ 3. Особенности обонятельной и вкусовой рецепции

Восприятие запаха. Высшие позвоночные животные воспринимают запах обонятельной выстилкой полости носа, низшие — так называемыми обонятельными мешками. У позвоночных выделено два типа обонятельных клеток: жгутиковые (у всех наземных и большинства первичноводных) и микровиллярные, или микроворсинчатые (у хрящевых и двоякодышащих рыб). На поверхность обонятельной выстилки выходят отростки обонятельных клеток, заканчивающиеся утолщениями — булавами. На поверхности булав в зависимости от типа клетки располагаются трубчатые фибриллы (9·2+2) или микроворсинки с сократимыми трубочками. Считают, что жгутики и микроворсинки являются теми чувствительными структурами, на которых расположены обонятельные рецепторы — белковые молекулы, воспринимающие пахучие вещества (Я. А. Винников, 1971, 1979; R. N. Cagan, 1980).

В настоящее время не существует полностью обоснованной физико-химической теории обонятельной рецепции, объясняющей взаимодействие пахучих веществ с рецепторами и их «узнавание».

В 60-е годы немалый интерес вызвала так называемая квантовая теория обоняния Райта, согласно которой в основе запаха молекул лежат особенности их внутримолекулярных колебаний, воспринимаемых «обонятельным пигментом». Молекулы «обонятельного пигмента», находящегося в обонятельной выстилке, должны резонансно взаимодействовать с колебаниями молекул пахучих веществ. В результате этого первичного акта индуцируются последующие процессы, заканчивающиеся серией нервных импульсов.

Эти представления Райта впоследствии не нашли убедительных подтверждений.

Широкое распространение получила стереохимическая концепция обоняния Эймура, в соответствии с которой форма молекулы определяет ее запах. Дж. Эймур выделил семь «первичных» запахов: камфарный, острый, эфирный, цветочный, мятный, мускусный и гнилостный. Были рассчитаны размеры рецепторных «лунок», воспринимающих эти первичные запахи. Так, лунки для камфарного и мускусного запахов обладают формой эллиптических

чаш разного размера, лунка для эфирной молекулы — вытянутая, для цветочной — имеет форму углубления с отводом и т. д. (рис. XXVI. 6). Острый запах обусловлен молекулами с большим сродством к электрону, гнилостные — нуклеофильными соединениями. Согласно Эймуру, молекула, способная попасть более чем в одну лунку, обладает сложным, смешанным запахом. Идеи Эймура нашли подтверждение в работах, где удалось синтезировать некоторые соединения с заранее предсказанным запахом.

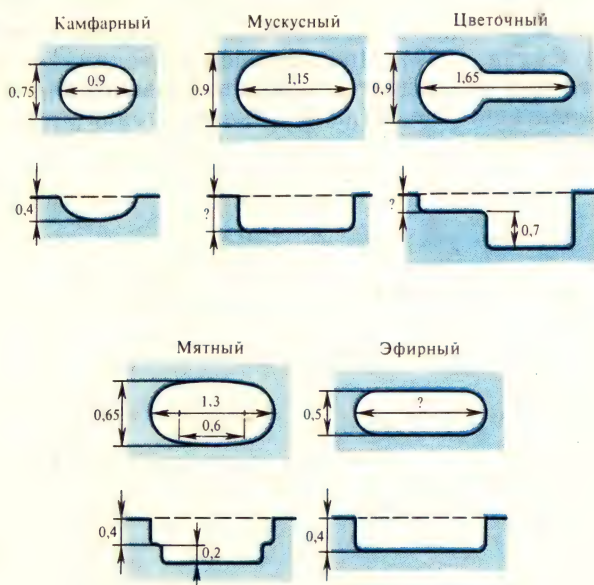


Рис. XXVI.6. Структуры рецепторных «лунок» (размеры в нанометрах), воспринимающих различные запахи (по Дж. Эймуру)

Попадание пахучих веществ на обонятельную выстилку вызывает в конечном итоге изменения ее свойств и появление электрического потенциала. Экспериментально можно измерить и зарегистрировать эти изменения, т. е. получить электроольфактограмму (от лат. *olfacto* — обонять). Однако цепь преобразований сигнала пахучей молекулы до конечного электрического сигнала остается пока во многом неясной, главным образом из-за недостатка данных о свойствах молекулярных структур, воспринимающих запахи. Исследования этих структур пока отстают от аналогичных работ в области рецепции гормонов. В конце 70-х — начале 80-х годов в нескольких лабораториях были предприняты успешные попытки выделения белков — рецепторов запаха (Е. Е. Фесенко, 1978; R. N. Cagan, 1980).

Вкусовая рецепция. Этот вид рецепции обусловлен так называемыми вкусовыми луковицами, которые у позвоночных находятся в эпителии языка, рта, губ, передних отделов гортани, глотки и пищевода. У ряда рыб они расположены на поверхности тела. Верхний (апикальный) отдел вкусовых луковиц сообщается с внешней средой (или с полостью рта). Вкусовые клетки находятся в составе клеток вкусовой луковицы. На вершине этих кле-

ток есть микроворсинки, которые обращены во внешнюю среду. На рецепторных мембранах вкусовых клеток расположены белки — рецепторы четырех основных вкусов: сладкого, горького, кислого и соленого.

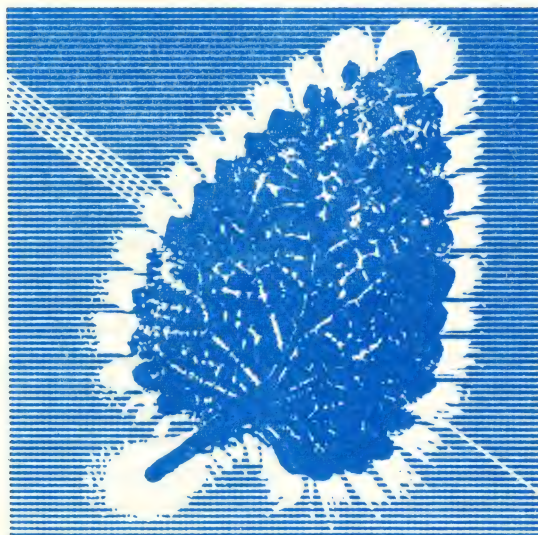
В последние годы отмечается прогресс в области исследования белковых рецепторов вкуса, особенно сладкого. Это, в частности, обусловлено тем, что найдены и выделены сладкие белки (монеллин, тауматин и миракулин) и антагонисты сладкого вкуса (гимнемовые кислоты и зизифин). Использование меченого монеллина (белок с молекулярной массой 10 000, в 3000 раз более сладкий, чем сахароза), выделенного из плодов *Dioscoreophyllum cumminsii*, позволило охарактеризовать рецептор сладкого вкуса по связыванию с ним, продемонстрировать специфичность взаимодействия, конкуренцию с сахарами (R. H. Sagan, 1979). При вкусовой рецепции, так же как и при рецепции запахов, сигнал от сладкого, горького, соленого или кислого вещества преобразуется в электрические сигналы. Многие стадии этого преобразования пока остаются неясными.

Часть четвертая

**Биофизика
фотобиологических процессов**

IX

**Первичные процессы
фотосинтеза**



XXVII

Трансформация энергии
в первичных процессах
фотосинтеза

XXVIII

Электронно-конформационные
взаимодействия
в первичных процессах
фотосинтеза

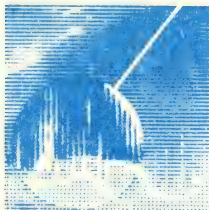
Фотобиология изучает действие света на различные биологические системы. Современный этап развития этой области биологии характеризуется глубоким проникновением в молекулярные механизмы первичных реакций, выяснением внутренней организации фотоэнергетических и фоторецепторных систем. Проблемы фотобиологии стали в центре внимания серьезных биофизических исследований, а их результаты во многом обогатили современную молекулярную биофизику и, в частности, способствовали раскрытию механизмов электронно-конформационных взаимодействий. Существуют разнообразные фотобиологические процессы, к важнейшим из которых относятся фотосинтез, зрение, фоторецепторные реакции, деструктивное действие ультрафиолетового света.

Во всех фотобиологических процессах энергия света необходима для преодоления активационных барьеров химических превращений. Однако в фотосинтезе при этом происходит непосредственное запасаение световой энергии в виде энергии химических связей, конечных продуктов (глюкоза), поскольку последние обладают большим запасом свободной энергии по сравнению с исходными веществами (CO_2 и H_2O). В остальных фотобиологических процессах свет также индуцирует фотохимические реакции, но в их продуктах не содержится избытка свободной энергии по сравнению с исходными веществами. Тем не менее и в этих случаях в последующих за фотохимической стадиях темновых процессах могут инициироваться сложные физиолого-биохимические превращения, в ходе которых мобилизуются большие количества свободной энергии, ранее запасенной в биоструктурах. Конечные результаты такого рода превращений (например, стимулирующее действие света на морфогенез, биосинтез пигментов, фотостимуляция дыхания) по общему энергетическому эффекту могут быть весьма велики, хотя непосредственного запасаения энергии света при этом и не происходит. Последовательность превращений в фотобиологических процессах может включать следующие стадии: поглощение света хромофорной группой и образование электронно-возбужденных состояний → миграция энергии электронного возбуждения → первичный фотофизический акт и появление первичных фотопродуктов → промежуточные стадии, включая перенос заряда, → образование первичных стабильных химических продуктов → физиолого-биохимические процессы → конечный фотобиологический эффект.

Выяснение механизмов и путей регуляции начальных этапов трансформации энергии электронного возбуждения и сопровождающих ее молекулярных превращений, включая изменения в хромофорных группах, их белковых носителях и окружающей мембране, представляет собой одну из основных задач биофизики. Эта проблема связана с выяснением роли и механизмов участия электронно-возбужденных состояний в биологических процессах. Специфическая особенность фотобиологических процессов, отличающая их от других темновых биохимических реакций, состоит в том, что источником электронного возбуждения здесь являются кванты света. Однако, несмотря на это отличие, биофизические исследования в области фотобиологии привели к установлению ряда закономерностей, имеющих общебиологическое значение.

Глава XXVII

Трансформация энергии в первичных процессах фотосинтеза



§ 1. Общая характеристика начальных стадий фотобиологических процессов

В гл. X, XII было показано, что при поглощении кванта света один из электронов, находящийся на нижнем энергетическом уровне на связывающей орбитали, переходит на верхний энергетический уровень, заполняя нижнюю разрыхляющую орбиталь и переводя тем самым молекулу в возбужденное электронное состояние (синглетное S_1 или триплетное T , см. рис. X.5). Существуют различные пути трансформации энергии возбуждения, включающие внутримолекулярную конверсию, безызлучательную передачу энергии возбуждения другой молекуле (миграция энергии) и использование энергии возбуждения в каких-либо фотохимических реакциях:



где k_ϕ , k_m , k — константы скоростей соответствующих процессов, причем k представляет собой суммарную вероятность внутримолекулярной дезактивации возбужденного состояния [см. (X.2.8)]: $k = p + q + r$, где p , q , r — частоты переходов в единицу времени с синглетного возбужденного уровня (S_1) на основной с испусканием света флуоресценции (p), тепловой дезактивации состояния $S_1(q)$, конверсии $S_1 \rightarrow T(r)$.

Согласно (X.2.10), выход флуоресценции без учета миграции энергии (k_m) равен

$$B = p / (p + q + r) = p / k, \quad (\text{XXVII.1.1})$$

а при учете фотохимического процесса

$$B_1 = p / (k + k_\phi). \quad (\text{XXVII.1.2})$$

Так как, согласно (X.2.8),

$$\tau = 1 / (p + q + r) = 1 / k, \quad (\text{XXVII.1.3})$$

то

$$B = p\tau. \quad (\text{XXVII.1.4})$$

При фотохимической дезактивации возбужденного состояния

$$\tau_1 = 1/(k + k_\Phi). \quad (\text{XXVII.1.5})$$

Аналогично получим, что

$$B_1 = 1/\tau_1 \quad (\text{XXVII.1.6})$$

или

$$\tau_1 = (1/p)B = \tau_0 B, \quad (\text{XXVII.1.7})$$

где $p = 1/\tau_0$ — вероятность флуоресценции.

Таким образом, время жизни τ_1 пропорционально величине выхода флуоресценции (B). Квантовая эффективность Φ фотохимического процесса связана с выходом флуоресценции B . Очевидно,

$$\Phi = k_\Phi / (k + k_\Phi). \quad (\text{XXVII.1.8})$$

Комбинируя уравнения (XXVII.1.1) — (XXVII.1.7), найдем

$$\Phi = 1 - B_1/B \text{ или } \Phi = 1 - \tau_1/\tau. \quad (\text{XXVII.1.9})$$

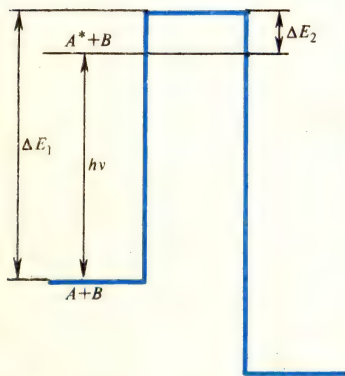
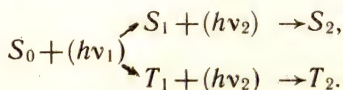


Рис. XXVII.1. Энергетическая схема фотохимического процесса $A^* + B \rightarrow P$:

ΔE_1 — энергия активации темновой реакции $A + B \rightarrow P$; ΔE_2 — энергия активации фотохимической реакции $A^* + B \rightarrow P$ ($\Delta E_1 > \Delta E_2$)

состоянии молекула обладает двумя неспаренными электронами, приобретая тем самым свойства анион-радикала на время существования возбуждения. Известно, что в реакционноспособных анион-радикалах, полученных путем восстановления нейтральных молекул, присоединенный электрон занимает нижнюю вакантную разрыхляющую орбиталь, но не может понизить свой энергетический уровень и перейти в систему связывающих орбиталей, поскольку последние полностью заполнены в нейтральной молекуле.

Собственно фотохимические превращения проходят, как правило, в виде одноквантовых фотохимических процессов. Исключение представляют условия мощного светового лазерного возбуждения, когда за время возбужденного состояния молекула успевает поглотить второй квант, так что становится возможным двухфотонное возбуждение одной молекулы и переход ее на верхние возбужденные уровни:

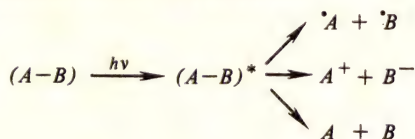


Механизмы одноквантовых фотохимических процессов весьма различны. Очевидно, что бимолекулярная фотореакция произойдет, когда второй реагент успеет достичь возбужденной молекулы до того, как она дезактивировалась.

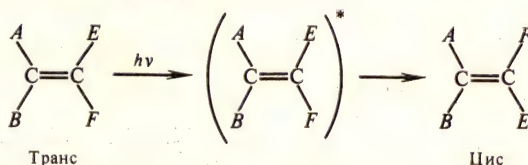
При этом должно выполняться соотношение $1/k_{\phi} \leq \tau$, где τ — время жизни соответствующего состояния S_1 или T .

Как правило, диффузионные процессы в конденсированных средах, которыми являются биологические мембраны, не успевают обеспечить высокую частоту встреч реагентов за время жизни S_1 состояния. Это затруднение, однако, несущественно для триплетного состояния. Оно также облегчается, если молекула образует комплекс со вторым реагентом в основном или возбужденном состоянии — эксиплекс. В этом случае возможна реакция присоединения, например образование димеров: $A + h\nu \rightarrow A^* + A \rightarrow (A^* \dots A) \rightarrow A_2$ или $A + h\nu_{\text{фл.}}$.

Возбужденные молекулы обычно реагируют мономолекулярно, т. е. диссоциируют с образованием ионов, радикалов:



или изомеризуются (фотоперегруппировка):



Фотохимическим путем может происходить перенос протона: его присоединение $A^* + \text{ВН} \rightarrow \text{АН}^+ + \text{В}^-$ или отдача $(\text{АН})^* + \text{В} \rightarrow \text{А}^- + \text{Н}^+ + \text{В}$, а также фотоперенос электрона по типу окислительно-восстановительных реакций: $A^* + \text{В} \rightarrow A^+ + \text{В}^-$; $A^* + \text{С} \rightarrow A^- + \text{С}^+$.

В биологических системах диффузионные процессы, как правило, ограничены по сравнению с растворами; константы скоростей обычных ферментативных процессов не превышают $10^2 - 10^3 \text{ с}^{-1}$. Это делает наиболее вероятным осуществление начальных стадий фотобиологических процессов по типу внутрикомплексных превращений. Иными словами, реакционный комплекс, включающий поглощающую свет молекулу-сенситизатор и молекулы других реагентов, исходно уже образован. Эта принципиальная особенность биологических систем накладывает глубокий отпечаток на механизмы трансформации и использования в них энергии электронного возбуждения.

§ 2. Общая схема первичных процессов фотосинтеза

В основе первичных процессов фотосинтеза (ППФ) лежит сложная совокупность окислительно-восстановительных реакций переноса электрона между компонентами электронно-транспортной цепи (ЭТЦ). Наибольший интерес представляют механизмы трех основных стадий трансформации энергии в ППФ: поглощение света фотосинтетическими пигментами и миграция энергии электронного возбуждения на РЦ фотосинтеза; первичное разделение зарядов и трансформация энергии в РЦ; перенос электрона по ЭТЦ и сопряженные с ним процессы, приводящие к образованию первичных стабильных продуктов (НАДФ и АТФ), используемых в дальнейших темновых реакциях фиксации CO_2 и образования конечных продуктов фотосинтеза.

Рассмотрим общие особенности функционирования и организации ППФ.

В фотосинтезе высших растений перенос электрона от воды (окислительно-восстановительный потенциал полувосстановления, $E_{1/2}$, при pH 7 равен +0,82 В) к НАДФ ($E_{1/2} \approx -0,32$ В) осуществляется при затрате энергии двух квантов света с участием соответственно двух функционально сопряженных и работающих последовательно фотосистем (ФС II и ФС I). Схема взаимодействия фотосистем и промежуточных переносчиков в ЭТЦ фотосинтеза

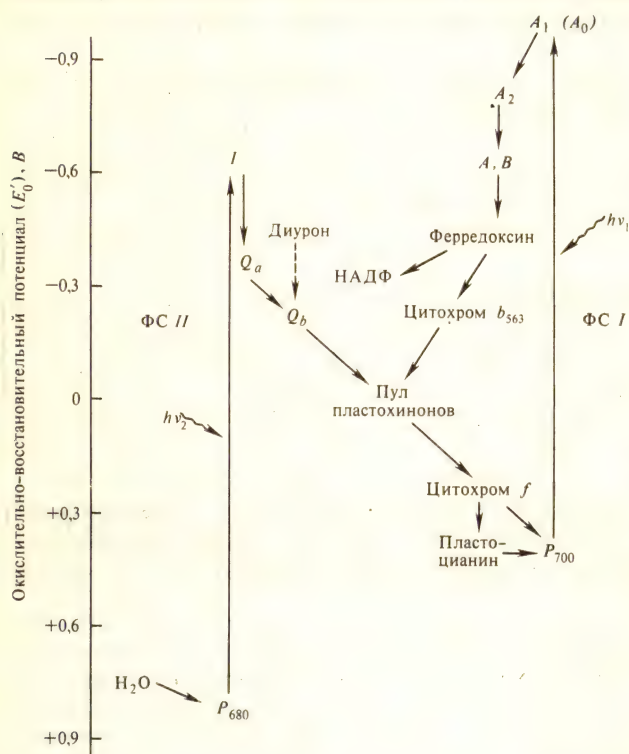


Рис. XXVII.2. Первичные процессы фотосинтеза высших растений: I—первичный акцептор ФС II; A₀, A₁, A₂—первичные акцепторы ФС I

В соответствии с представлениями о последовательном взаимодействии двух фотосистем (ФС I и ФС II) в так называемой Z-схеме фотосинтеза восстановленные продукты ФС II служат донорами электронов для ФС I. Возбуждение светом, который в основном поглощается ФС II, приводит к восстановлению промежуточных переносчиков в ЦЭТ, а возбуждение ФС I, наоборот, к их окислению

высших растений показана на рис. XXVII.2; там же даны соответствующие значения $E_{1/2}$ компонентов ЭТЦ.

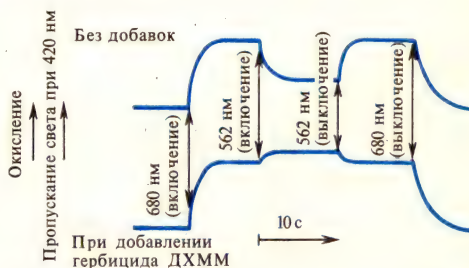
Некоторые общие особенности функционирования этой системы были установлены еще до расшифровки деталей ее организации.

В 30-е годы известными опытами Р. Эмерсона и В. Арнольда с прерывистым освещением было измерено количество кислорода, выделяемого клетками хлореллы под действием вспышек света длительностью $\sim 10^{-5}$ с. Величина темнового интервала ($\sim 0,02$ с) между вспышками, необходимого для использования поглощенной световой энергии и выделения O_2 , ясно указывала на участие ферментов, лимитирующих общую скорость ППФ. При относительно большом числе промежуточных стадий переноса (рис. XXVII.2) это, очевидно, свидетельствует о больших скоростях отдельных этапов транспорта электрона. Было также показано, что ферментативная система, ответственная за выделение одной молекулы O_2 , обслуживается одновременно несколькими сотнями молекул хлорофилла. Комплекс светособирающих пигментных молекул, передающих

энергию на один фотоактивный центр (ФС I и ФС II), получил название фотосинтетической единицы (ФСЕ).

Оставалось, однако, неясным, отражает ли понятие ФСЕ реальную молекулярную организацию фотосинтетических мембран, когда каждый светособирающий пигментный комплекс обслуживает «свой» РЦ, (уницентральная модель). Другая возможность состоит в том, что РЦ как бы вкраплены в свето-

Рис. XXVII.3. Окисление и восстановление цитохрома f при действии дальнего красного ($\lambda > 680$ нм) и красного ($\lambda \sim 562$ нм) света



собирающую антенну, а перенос энергии возбуждения носит статистический характер и не имеет никаких топографических ограничений (мультицентральная модель).

Пигментные системы, входящие в состав ФС I и ФС II, отличаются по своим спектральным свойствам, а хлорофилл ФС I поглощает в более длинноволновой области по сравнению с хлорофиллом ФС II. Это позволяет селективно возбуждать фотосистемы: отдельно ФС I ($\lambda > 680$ нм) и вместе ФС I + ФС II ($\lambda < 680$ нм).

Опытами Л. Н. М. Дюйзенса (1961) на водорослях методами абсорбционной дифференциальной спектрометрии показано, что длинноволновый свет ($\lambda > 680$ нм) вызывает окисление цитохрома f (регистрировалось по уменьшению поглощения при 420 нм). Использование коротковолнового освещения ($\lambda \sim 562$ нм) приводило к частичному восстановлению цитохрома f (рис. XXVII.3). Ингибитор фотосинтеза ДХММ (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина), или диурон, снимал восстанавливающее действие коротковолнового света. Согласно Z-схеме (см. рис. XXVII.2), дальний красный свет окисляет цитохром, отбирая от него электроны для восстановления первичного окислителя, образуемого ФС I. Коротковолновый свет восполняет убыль электронов на цитохроме за счет восстановления его ФС II. Диурон блокирует этот процесс, что приводит к ингибированию выделения O_2 . Объект можно освещать двумя последовательными вспышками света: вначале красного ($\lambda < 680$ нм), затем дальнего красного света ($\lambda > 680$ нм). Тогда электроны, освобожденные в ФС II в ответ на первую вспышку, достигнут через определенное время цитохрома f , который затем окислится фотосистемой ФС I под действием второй вспышки. Варьирование интервала времени между вспышками позволяет определить время, необходимое для переноса электрона на цитохром от ФС II; оно составляет $\sim 5 \cdot 10^{-3}$ с.

Роль донора электронов для ФС I, видимо, играет пластоцианин — медьсодержащий белок ($E_{1/2} \sim +0,37$ В). Электроны от первичных акцепторов ФС II принимают на себя пластохиноны ($E_{1/2} \sim +0,06$ В), единственные двухэлектронные переносчики в ЭТЦ, которые при восстановлении одновременно присоединяют протоны. Помимо цитохрома f , существуют цитохромы b (цит. b_6 , $E_{1/2} \sim -0,03$ В), которые контактируют с ФС I и участвуют в циклическом

электронном транспорте. Цитохром b_3 в большей степени связан с ФС II, так что на каждый РЦ приходится 1—2 молекулы этого цитохрома. Такова последовательность донорно-акцепторных актов, сопровождающих перенос электрона по ЭТЦ в хлоропластах (см. рис. XXVII.2).

Важнейшая особенность топографической организации ППФ состоит в том, что отдельные переносчики ЭТЦ в хлоропластах объединены в единые электрон-

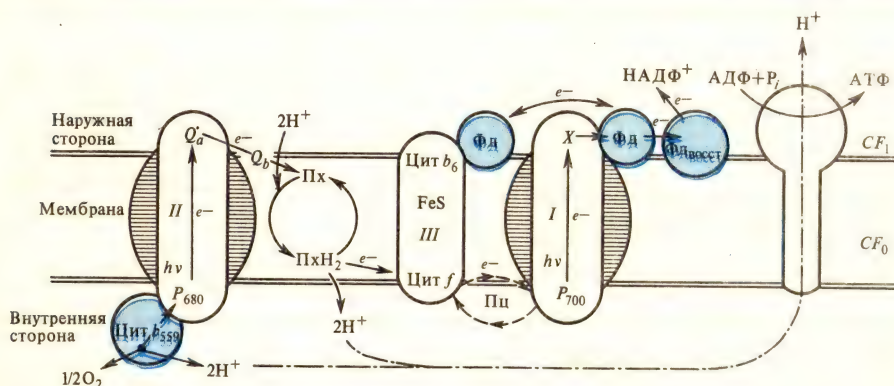


Рис. XXVII.4. Электрон-транспортная цепь фотосинтеза и сопрягающий комплекс в мембране тилакоида:

I —комплекс ФС I, II —комплекс ФС II, III —цитохромный b_6-f -комплекс, CF_1-CF_0 —сопрягающий комплекс, Фд—ферредоксин, Фд_{акс}—ферредоксин-НАДФ-редуктаза; пути электронного транспорта обозначены стрелками (остальные объяснения см. в тексте)

но-транспортные макромолекулярные комплексы, локализованные в фотосинтетических мембранах. Наибольшее значение имеют следующие из них: светособирающий пигмент-белковый комплекс (ССПБК), от которого энергия возбуждения направляется на РЦ; комплексы фотосистем ФС II (ПБК II) и ФС I (ПБК I), включающие помимо светособирающего, или антенного, хлорофилла a фотохимически активные пигменты P_{680} и P_{700} соответственно, а также непосредственные доноры и акцепторы электронов для РЦ фотосистем; цитохромный комплекс b_6-f , который состоит из пяти белковых субъединиц и включает цитохром f , два цитохрома b_6 , а также железосерный белок Риске. Цитохромный комплекс ответствен за последовательный перенос электрона между фотосистемами и циклический транспорт электронов вокруг ФС I. АТФазный сопрягающий комплекс CF_0-CF_1 был рассмотрен в гл. XXIV.

На рис. XXVII.4 схематически показано расположение этих комплексов в фотосинтетической мембране тилакоида. Как видно, электрон на своем пути пересекает мембрану, проходя через комплекс b_6-f от ее внутренней стороны, где расположена донорная часть ФС II, на наружную сторону к акцепторному участку ФС I. Взаимодействие между макромолекулярными комплексами ФС I, b_6-f и ФС II осуществляется при посредстве подвижных переносчиков — пластоцианина (Пц) и пластохинона (Пх), причем молекулы последнего образуют пул, содержащий не менее 10 молекул Пх на один Пц. Другой подвижный переносчик — ферредоксин акцептирует электроны у ФС I, осуществляя связь ППФ с темновыми процессами. Своеобразное сочетание обычных диффузионных и внутрикомплексных реакций в ЭТЦ накладывает свой глубокий отпечаток на кинетику и физические механизмы переноса электрона.

Приведенная на рис. XXVII.4 схема показывает асимметричный характер поперечного расположения донорных и акцепторных компонентов ФС I и ФС II в мембране тилакоида. В последние годы стало ясно (Дж. Андерсон, Дж. Барбер), что и латеральное расположение комплексов в плоскости мембраны носит явно выраженный гетерогенный характер (рис. XXVII.5). Как видно из рисунка, пигментные системы ФС II и ФС I пространственно

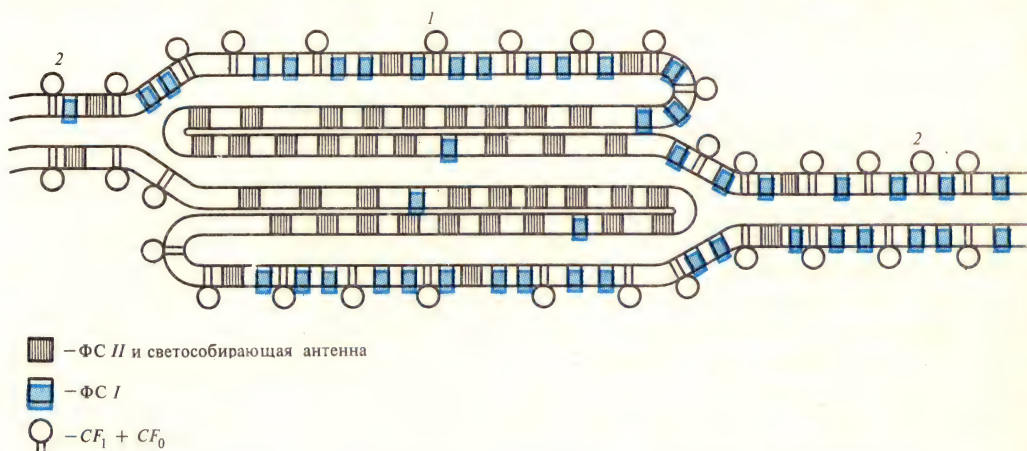


Рис. XXVII.5. Гетерогенное распределение комплексов фотосистем и сопрягающего фактора в латеральном плане мембран:

1—мембраны гран, 2—мембраны стромы

Гранальная часть мембраны тилакоида содержит комплексы ФС II и светособирающий пигмент-белковый комплекс (ПБК). В то же время стромальная часть тилакоида (ламеллы, соединяющие граны тилакоида) содержит в основном комплексы ФС I и только 10—20% общего количества комплексов, содержащих РЦ ФС II и светособирающего комплекса ССПКБ. Здесь же одновременно присутствуют ферредоксин-НАДФ-редуктаза и сопрягающий фактор CF_0

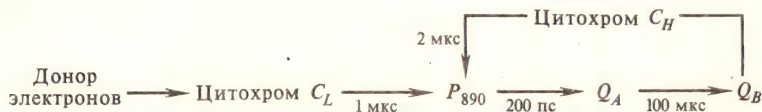


Рис. XXVII.6. Общая схема первичных процессов переноса электрона в фотосинтезе бактериального типа

разобщены, что затрудняет миграцию энергии электронного возбуждения между ними.

Важным фактором, регулирующим этот процесс, становится конформационное состояние мембраны тилакоида и белковой части ССПБК, а также движения комплексов, от которых зависят расстояния между молекулами пигментов, входящих в состав ФС II и ФС I. Одновременно возрастает и роль подвижных переносчиков, обеспечивающих перенос электрона между этими комплексами.

На рис. XXVII.6 приведена схема ППФ бактериального типа, где источником электронов служат внешние доноры водорода (простые органические

молекулы, сероводород). У ряда бактерий перенос электронов осуществляется с участием двух типов цитохромов: высокопотенциального $C_H(E_{1/2} \sim +300 \text{ мВ})$ и низкопотенциального $C_L(E_{1/2} \sim +10 \text{ мВ})$. Высокопотенциальные цитохромы — обязательные участники энергопреобразующего циклического переноса электрона в фотосинтетических мембранах, низкопотенциальные — обеспечивают связь системы циклического переноса с внешними донорами электронов. Циклический поток включает цитохромный комплекс $(b-c)$, восстанавливающий C_H . Роль первичного Q_A и вторичного Q_B акцепторов электронов для фотоактивного пигментного комплекса РЦ играют хиноны (см. § 9 гл. XXVII).

§ 3. Миграция энергии и строение фотосинтетического пигментного аппарата

Доставка энергии электронного возбуждения к РЦ фотосистем I и II высших растений и РЦ бактериального фотосинтеза осуществляется за счет миграции энергии в светособирающей антенне. Миграция энергии в фотосинтезе — наиболее изученный тип безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения в биологических системах (см. § 9—11 гл. XIII). Ее функциональное биологическое значение состоит в повышении эффективности использования поглощенных световых квантов. Действительно, среднее время, необходимое для утилизации энергии кванта света (выделение молекулы O_2), составляет всего 0,01—0,02 с. Время регенерации фотоактивного пигмента РЦ намного меньше этой величины ($\leq 10^{-6} \text{ с}$). Интенсивность дневного солнечного света достигает $10^{15}—10^{16} \text{ квант} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Сечение поглощения молекулы пигмента составляет $10^{-15}—10^{-16} \text{ см}^2$. Следовательно, каждая отдельная молекула хлорофилла будет поглощать не более $1—10 \text{ квант} \cdot \text{с}^{-1}$, а при обычных интенсивностях света — еще меньше. В этом случае РЦ, имеющий одну поглощающую свет молекулу хлорофилла, будет значительную часть времени «простаивать». Объединение многих десятков молекул пигментов в фотосинтетическую единицу (ФСЕ), обслуживающую один фотоактивный пигмент, предотвращает такого рода потери поглощенной световой энергии.

Эффективность и направленность миграции энергии по фотосинтетической пигментной матрице зависит от расположения, ориентации молекул пигментов и расстояний между ними в ПБК. Эти факторы в сочетании с различными условиями светового возбуждения могут привести к тому, что перенос энергии между разными группами пигментов будет происходить по разным физическим механизмам (см. § 9—11 гл. XIII) в пределах одной ФСЕ.

Существование различных форм пигментов, которые отличаются друг от друга по положениям максимумов своих спектров поглощения и флуоресценции, было установлено уже давно (А. А. Красновский, Ф. Ф. Литвин). На рис. XXVII.7 представлена общая картина переноса энергии между разными формами. Миграция энергии осуществляется в соответствии с общими принципами индуктивно-резонансного механизма ($\lambda_{\text{флуор}}^{\text{max D}} < \lambda_{\text{полг}}^{\text{max A}}$).

Пути миграции энергии возбуждения. Физические механизмы и пути миграции энергии связаны с особенностями молекулярной организации ПБК в фотосинтетических мембранах. Прогресс в изучении этих механизмов был достигнут на пути совершенствования препаративных методов выделения ПБК, обладающих нативными свойствами. Электрофоретический и хроматографический анализ солюбилизованных различными детергентами фотосинтетических мембран убедительно показал существование нескольких типов ПБК с определенным набором пигментов, встроенных в липопротеиновый матрикс. В состав главного ССПБК входит около 50—60% всего хлорофилла.

С одной элементарной его субъединицей связано 6—10 молекул хлорофилла: 4—5 молекул Хл *a*, 3—4 молекулы Хл *b* и 1—2 молекулы каротиноидов.

Молекулы хлорофилла в субъединице плотно упакованы и находятся, видимо, в экситонном взаимодействии. В структуре ССПБК существуют две флуоресцирующие формы: одна с максимумом флуоресценции 695 нм, другая — 680—681 нм (Хл⁶⁹⁵, Хл⁶⁸⁰). Это указывает на то, что в ССПБК функ-

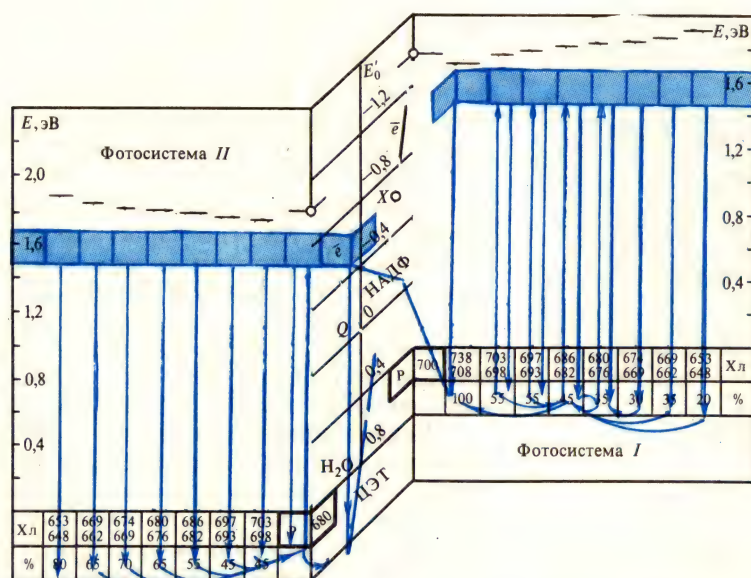


Рис. XXVII.7. Система миграции энергии в листе между различными формами пигментов: P_{700} и P_{680} —реакционные центры ФС I и ФС II

Для ФС I и ФС II показаны различные формы хлорофилла (Хл) с соответствующими энергетическими уровнями и процентным содержанием по отношению к P_{700}

ционируют два канала миграции энергии, начинающиеся на коротковолновых формах Хл_b и заканчивающиеся формами Хл_a⁶⁸⁰ и Хл_a⁶⁹⁵ соответственно.

Дипольные моменты главного электронного Q_y -перехода обеих конечных форм Хл_a лежат в плоскости мембраны, где локализован ССПБК. Большая часть светособирающего комплекса связана в мембранах с ФС II, меньшая — с ФС I (см. рис. XXVII.4). Возможно, что формы Хл_a⁶⁸⁰ и Хл_a⁶⁹⁵, принадлежащие ССПБК, служат независимыми донорами энергии для различных форм хлорофилла, входящих в состав тех частей ПБК, которые уже непосредственно обслуживают РЦ соответствующих фотосистем (ПБК I и ПБК II). В ПБК I такими акцепторными формами служат Хл_a⁶⁹⁴ и в меньшей степени Хл_a⁷¹², видимо, локализованная снаружи белковой матрицы; их Q_y -переходы также расположены преимущественно в плоскости мембраны.

Для хлорофилла ПБК I характерна в основном флуоресценция с максимумом около 735 нм (формы Хл_a⁷¹², Хл_a⁷⁰²) и в меньшей степени — около 692—694 нм (Хл_a⁶⁹⁴). Флуоресценция при 694 нм формы Хл_a⁶⁹⁴ характерна для

«ядра» ПБК I, которое обогащено фотоактивным пигментом реакционного центра P_{700} . Для ПБК II главной характерной чертой является наличие двух максимумов флуоресценции при 685—687 и 695 нм. Дипольный момент перехода 685 нм параллелен плоскости фотосинтетической мембраны. В то же время переход при 695 нм является единственной полосой в спектре флуоресценции хлоропластов с перпендикулярной относительно плоскости мембраны ориентацией дипольного момента. Считают, что форма Хл a^{685} акцептирует и передает

энергию непосредственно на РЦ ФС II, а флуоресценция при 695 нм может принадлежать пигментам, входящим в состав РЦ ФС II, либо особой форме Хл a , либо феофитину. Возможно, существует по-иному расположенная в мембране небольшая фракция ССПБК, которая служит дополнительным регулятором распределения энергии между фотосистемами.

Общая схема возможных путей распределения энергии в ССПБК, ПБК I и ПБК II приведена на рис. XXVII.8. Пространственная разобщенность фотосистем, сосредоточенных в разных частях тилакоидной мембраны, очевидно (см. рис. XXVII.5), затрудняет прямой перенос энергии возбуждения от ПБК II и ПБК I, хотя спектральные свойства соответствующих пигментных форм делают его вполне возможным.

Перераспределение энергии возбуждения.

Известно, что при одновременном возбуждении объекта (хлорелла) коротковолновым и длинноволновым красным светом скорость фотосинтеза выше, чем суммарная скорость, складывающаяся из скоростей раздельного возбуждения двумя длинами волн (эффект Эмерсона). Отсюда следует вывод о необходимости одновременного функционирования в фотосинтезе обеих фотосистем. Очевидно, между пигментными системами ФС II и ФС I происходит непосредственное перераспределение поглощенной энергии в зависимости от интенсивности и спектрального состава освещения. Показано, что освещение дальним красным светом ФС I вызывает такое изменение фотосинтетического

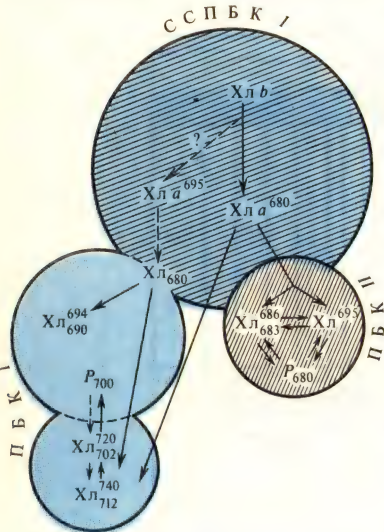


Рис. XXVII.8. Миграция энергии в фотосинтетической мембране высших растений через отдельные формы хлорофилла, обозначенные на схеме

Пигмент-белковый комплекс (ПБК) играет роль резервуара, откуда энергия направляется на реакционные центры фотосистем

аппарата, при котором большая часть квантов передается в фотосистему II. Это приводит к повышению флуоресценции, выход которой у ФС II больше, чем у ФС I. Свет с меньшей длиной волны дает обратный эффект. Состояние с более высоким выходом флуоресценции, индуцированное освещением дальним красным светом, называется состоянием 1, а состояние с низким выходом флуоресценции — состоянием 2. Перераспределение квантов между двумя фотосистемами может быть обусловлено как увеличением миграции на ПБК I из ССПБК, так и перераспределением квантов, уже попавших на ФС II, и их миграцией на ФС I. Последнее явление получило название *спилловер* (от англ. *spillover* — переливание через край).

Механизм перераспределения энергии между фотосистемами носит сложный характер и в основном связан с конформационным состоянием фотосинтетических мембран, от которого зависят как взаимные расстояния и

ориентации пигментных комплексов ФС I и ФС II, так и их связь с ССПБК. В свою очередь, это определяется присутствием ионов, pH среды и в особенности степенью фосфорилирования белков светособирающего ПБК. Фосфорилирование белков ССПБК приводит к увеличению миграции энергии к ФС I, т. е. переводит систему в состояние 2. Аналогичные результаты получают и при инкубации мембран тилакоидов с АТФ на свету. Низкая концентрация катионов (Mg^{2+}) обеспечивает максимальный перенос энергии от ФС II к ФС I. В то же время высокая концентрация Mg^{2+} снижает эффективность спилловера. Если мембранные белки тилакоидов фосфорилированы и в среде отсутствуют ионы Mg, то 75% общего числа поглощенных квантов направляется к ФС I. Переходы $1 \rightleftharpoons 2$ сопровождаются структурными изменениями в мембранах, в частности уменьшением степени слипания мембран тилакоидов в состоянии 2.

Основной причиной конформационных изменений в мембранах тилакоидов и перераспределения энергии возбуждения между ФС II и ФС I является изменение заряда ССПБК при его фосфорилировании. Даже в отсутствие фосфорилирования светособирающего комплекса, при низкой концентрации ионов, отрицательные заряды, находящиеся на поверхности мембранных белков, создают высокий поверхностный электрический потенциал на тилакоидных мембранах и препятствуют слипанию тилакоидов. В этих условиях ФС I и ССПБК, связанный с ФС II, равномерно распределены в плоскости мембраны, благодаря чему возможна эффективная миграция энергии от ФС II к ФС I. Добавление 100 мМ одновалентных катионов или 1 мМ двухвалентных катионов частично экранирует отрицательные заряды белков. Менее заряженные комплексы ССПБК и ФС II обеспечивают слипание соседних мембран в граны за счет ван-дер-ваальсовых сил притяжения гидрофобных участков. Имеющие большой заряд комплексы ФС I вытесняются из области контакта и остаются в одиночных стромальных участках тилакоидов. В этих условиях перенос энергии возбуждения от ПБК II к ФС I минимален. Миграция энергии в целой клетке регулируется путем обратимого фосфорилирования ССПБК с помощью мембранной протеинкиназы, находящейся в гранальных участках мембраны. Фосфорилирование ССПБК приводит к появлению на нем дополнительного отрицательного заряда, что вызывает переход ССПБК в стромальный участок мембраны и возрастание переноса энергии от него к ФС I.

В стромальном участке мембраны находится протеинфосфатаза, которая дефосфорилирует ССПБК, вызывая тем самым возвращение его в гранальную мембрану. Протеинкиназа активируется при восстановлении пластохинона, переносящего электроны между ФС I и ФС II, и переходит в неактивное состояние при его окислении. Активность протеинфосфатазы сохраняется постоянной. Таким образом, пластохинон служит «датчиком» для сохранения баланса энергии возбуждения между фотосистемами. Избыточное возбуждение ФС II вызывает перевосстановление пластохинона и активацию протеинкиназы. Тогда при фосфорилировании переход части ССПБК из гран в стромальные мембраны уменьшает поток возбуждений в ФС II и увеличивает его в ФС I. В результате выравниваются скорости возбуждения ФС I и ФС II, а степень восстановления пластохинона опять уменьшается. Напротив, избыточное окисление пластохинона при преимущественном возбуждении ФС I вызывает инактивацию протеинкиназы и возвращение ССПБК в граны вследствие дефосфорилирования его протеинфосфатазой.

Перераспределение энергии между фотосистемами отражает большую роль факторов физиолого-биохимической регуляции в тилакоидной мембране, которые имеют важное значение наряду с обычными физическими факторами, определяющими миграцию энергии (см. § 9—10 гл. XIII). Значение этой

регуляции заключается в возможности изменять соотношение между нециклическим и циклическим электронными потоками, преимущественно ускоряя последний при фосфорилировании ССПБК.

Локализация большей части ФС II (ФСII_α) в гранальной области обеспечивает основной нециклический поток электронов, восстанавливающий молекулы пластохинона, которые затем диффундируют в стромальную область, отдавая электроны ФС I. Меньшая часть ФС II (ФСII_β), обладающая и меньшей частью ССПБК II в стромальной области, обеспечивает более слабый поток, взаимодействующий с интенсивным циклическим потоком ФС I — источником энергии фосфорилирования и синтеза АТФ.

Итак, характер расположения и взаимодействия главных макромолекулярных комплексов меняется в зависимости от конформационного состояния тилакоидной мембраны. Организация фотосинтетической единицы (см. § 2 гл. XXVII), видимо, также тесно связана с состоянием мембран тилакоидов, которое определяет степень обособленности отдельных частей ССПБК и контактирующих с ними РЦ фотосистем. В зависимости от степени слипания отдельных участков мембраны возможны и различные переходы от унитарной до мультицентральной организации ФСЕ. Такие факторы, как температура, ионный состав, рН среды, состояние липидной фазы, определяют архитектуру и вязкость мембран, а следовательно, и латеральную подвижность комплексов. С этой точки зрения ясно, что приведенная на рис. XXVII.2 Z-схема фотосинтеза носит достаточно условный характер, отражая лишь основную направленность процессов переноса электрона. В пределах этой схемы скорости и соотношения между потоками электронов на отдельных участках цепи меняются в зависимости от физиолого-биохимического состояния клеток фотосинтезирующего организма.

§ 4. Механизмы миграции энергии в фотосинтетической мембране

Захват энергии возбуждения в РЦ. Первичная трансформация энергии в фотосинтезе осуществляется, когда энергия электронного возбуждения, мигрируя по светособирающей матрице, захватывается фотоактивным пигментом реакционного центра. Первые измерения длительности и выхода флуоресценции (см. § 2 гл. X) пигментов (хлорофилл, бактериохлорофилл) в растворе (τ и B), и в клетках фотосинтезирующих организмов (τ_1 и B_1) показали (С. Броди, А. Н. Теренин), что эти величины составляют: $\tau \approx 5$ нс, $B \approx 0,3$, $\tau_1 \approx 0,3$ нс, $B_1 \approx 0,02$.

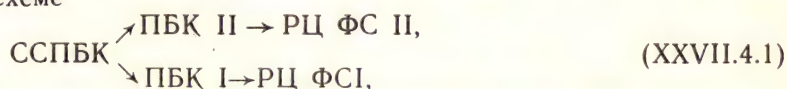
Квантовый выход первичных процессов фотосинтеза достаточно высок. Поэтому указанное сокращение длительности и выхода флуоресценции пигментов в живых системах должно быть главным образом обусловлено не тепловыми потерями, а процессом «фотохимической» дезактивации синглетного возбуждения состояния (S_1) в реакционных центрах фотосинтеза. Независимо от механизма этого процесса РЦ следует рассматривать как естественные фотохимические тушители флуоресценции молекул пигментов светособирающей матрицы. Можно оценить эффективность этого тушения, считая, что в фотосинтетической мембране значения констант p , q , r (см. § 1 гл. XXVII) сохраняются неизменными, а процесс тушения флуоресценции при захвате энергии реакционными центрами эквивалентен фотохимической дезактивации (k_f) состояния S_1 молекул антенны. Тогда, подставляя величины τ , B , τ_1 , B_1 в формулы (XXVII.1.9) — (XXVII.1.10), найдем, что эффективность захвата возбуждения реакционными центрами составляет $\Phi_{\text{захв}} \approx 0,93 \div 0,95$.

Сами РЦ обладают высокой фотохимической активностью, величина

квантовой эффективности первичного фотохимического процесса в них близка к единице. Отсюда и из (XXVII.1.10) следует, что в самом РЦ длительность возбужденного состояния молекулы фотоактивного пигмента, в течение которого должен произойти первичный акт фотосинтеза, не превышает $\tau_1 \simeq 10^{-11}$ с.

Таким образом, после поглощения света в фотосинтетической мембране на первом этапе происходит миграция энергии электронного возбуждения по светособирающей матрице и захват ее реакционными центрами за времена порядка 0,2—0,3 нс. На втором этапе уже непосредственно в реакционных центрах энергия электронного возбуждения используется в первичном фотохимическом акте за время $\sim 10^{-11}$ с.

Какие факторы влияют на длительность и выход флуоресценции пигментов в фотосинтетической мембране? Организация фотосинтетической мембраны носит явно выраженный гетерогенный характер, где группы пигментов объединены в соответствующие ПБК. Отдельные ПБК, передающие энергию возбуждения по общей схеме

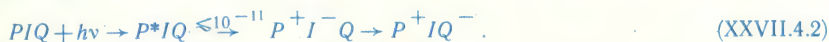


могут характеризоваться и различными временами жизни флуоресценции в зависимости от характера их взаимодействия и расстояния между белковыми носителями и фиксированными на них молекулами пигментов. Соответственно могут различаться механизмы миграции энергии между молекулами пигментов в случае переноса между разными ПБК или при миграции в пределах одного и того же ПБК. Эти особенности должны проявляться в наличии нескольких компонентов затухания флуоресценции разных групп пигментов, передающих друг другу энергию и отличающихся по спектральному составу флуоресценции. Можно ожидать также и проявления зависимости длительности флуоресценции от температуры, например, при миграции энергии по механизму некогерентного экситона, которая носит активационный характер (см. § 11 гл. XIII).

Длительность флуоресценции групп ПБК, обслуживающих непосредственно реакционные центры, должна также зависеть и от эффективности самого процесса захвата энергии возбуждения в РЦ, т. е. от процесса «фотосинтетического» тушения флуоресценции. Последнее обстоятельство определяется не только взаимодействием между РЦ и принадлежащим ему ПБК, но и состоянием самого РЦ. Очевидно, активные РЦ, эффективно трансформирующие энергию электронного возбуждения, дают начало электронному потоку в ЭЦ фотосинтеза и одновременно являются активными тушителями флуоресценции ПБК. Наоборот, РЦ, которые по каким-либо причинам не могут передавать электроны в цепь фотосинтеза, не в состоянии утилизировать энергию электронного возбуждения, которая, следовательно, остается в ПБК неиспользованной и может высвечиваться в виде флуоресценции с большим временем жизни.

Указанные выше закономерности относятся не только к длительности, но и выходу флуоресценции, величины которых связаны между собой соотношением (XXVII.1.4). Однако экспериментальное определение длительности флуоресценции имеет определенные преимущества, так как оно дает непосредственную информацию о кинетике процессов дезактивации электронных возбужденных состояний [см. (X.2.9)]. В то же время определение выхода флуоресценции сопряжено с необходимостью учитывать энергию, поглощенную именно данной группой пигментов, что весьма затруднительно в гетерогенной фотосинтетической мембране.

Фотосинтетические реакционные центры. Основной принцип работы РЦ состоит в том, что возбуждение фотоактивного пигмента приводит к отрыву от него электрона и восстановлению первичного акцептора, который затем передает электрон следующему акцептору и далее в ЭТЦ. Общая схема работы РЦ имеет вид



Последующее восстановление P^+ происходит от доноров электрона в ЭТЦ в соответствии с рис. XXVII.2 и XXVII.5. В схеме (XXVII.4.2) символом PIQ обозначены компоненты РЦ: P — фотоактивный пигмент, I — первичный акцептор, Q — следующий за ним акцептор. Роль I в РЦ выполняют порфириновые молекулы пигментов (хлорофилл в РЦ ФС I, феофитин в РЦ ФС II, бактериофеофитин в РЦ пурпурных бактерий). В качестве вторичного акцептора выступают молекулы хинона (РЦ пурпурных бактерий), пластохинона (РЦ ФС II) или железосерные белки (РЦ ФС I). Эффективность отрыва электрона от P^* и перенос его на I и далее на Q зависят от состояния компонентов РЦ. Так, если Q исходно восстановить в темноте, например за счет создания достаточно низкого окислительно-восстановительного потенциала (E_h) в среде, то на свету перенос электрона на Q уже не может произойти. Точно так же химическое окисление фотоактивного пигмента отнимает у него электрон и тем самым мешает его способности отдавать электрон на свету первичному акцептору I . Реакционные центры, находящиеся в активном состоянии PIQ , где перенос электрона от P^* совершается нормально, называются открытыми центрами. Если РЦ не может отдавать электроны в фотосинтетическую ЭТЦ, то он находится в закрытом состоянии (P^+I^-Q , P^+IQ^- , P^+IQ , PIQ^- или PI^-Q) и не может столь же эффективно тушить флуоресценцию соответствующего ПБК.

Длительность флуоресценции пигментных форм. Значения длительности флуоресценции пигментов в клетке были впервые получены методом фазовой флуорометрии. Метод основан на измерениях сдвига фазы между синусоидально модулированным возбуждающим световым потоком и возникающим под его действием потоком флуоресценции в образце. Сдвиг фазы появляется вследствие задержки поглощенных квантов перед высвечиванием их флуоресцирующими молекулами. Метод дает хорошие результаты, когда в системе имеется лишь один вид молекул с одним общим средним временем экспоненциального затухания флуоресценции. В случае нескольких компонентов флуоресценции, количество, времена и законы затухания которых заранее не известны, возможности метода фазовой флуорометрии становятся ограниченными.

В последние годы благодаря развитию лазерной техники и, в частности, получению пикосекундных (10^{-12} с) и субпикосекундных ($\sim 10^{-13}$ с) световых импульсов появились методы импульсной пикосекундной спектрофлуорометрии. Флуоресценция образца здесь возбуждается импульсом света, длительность которого намного меньше времени жизни флуоресцентного состояния исследуемых молекул. Кинетика затухания флуоресценции регистрируется при разных длинах волн в спектре испускания, а также при различных длинах волн возбуждающего лазерного импульса. В результате исследований (1975—1982) удалось доказать, что кинетика затухания флуоресценции включает несколько компонентов с различными временами жизни и спектральным составом, которые соответствуют гетерогенному характеру организации пигментного аппарата и характеризуют свечение его отдельных частей. Как правило, при комнатной температуре обнаруживаются три компонента свечения с временами жизни, варьирующими в пределах: $\tau_1 \simeq 60 \div 120$ пс, $\tau_2 \simeq 200 \div 500$

пс, $\tau_3 \approx 1500 \div 2500$ пс. В зависимости от состояния и природы объекта возможны весьма широкие отклонения от этих величин.

На рис. XXVII.9 приведена в качестве примера запись кинетики затухания флуоресценции хлоропластов, где ясно видны три компонента с временами $\tau_1 \approx 80$ пс, $\tau_2 \approx 300$ пс, $\tau_3 \approx 4500$ пс. В других опытах значения τ компонентов

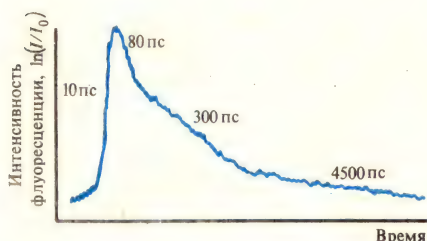


Рис. XXVII.9. Кинетика затухания флуоресценции в хлоропластах гороха при возбуждении пикосекундным импульсом света:

цифрами показаны значения τ (пс) компонент затухания флуоресценции

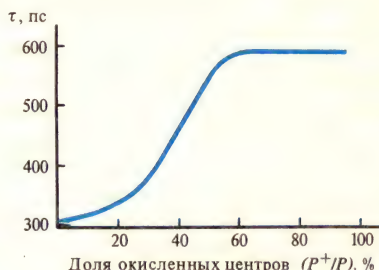


Рис. XXVII.10. Длительность флуоресценции хроматофоров в зависимости от степени окисленности фотоактивного пигмента (P) в реакционном центре

затухания составляли 100, 400 и 1100 или 180, 500, 1400 пс. В настоящее время существует общепринятое представление о том, что кинетику затухания флуоресценции в интактных системах (хлоропласты высших растений, целые клетки зеленых водорослей) следует описывать в трехэкспоненциальном приближении ($\tau_1 = 80 \div 150$ пс, $\tau_2 = 300 \div 500$ пс и $\tau_3 = 1000 \div 4500$ пс).

Амплитуды и времена жизни соответствующих компонентов по-разному реагируют на изменение состояния ФС I и ФС II. Для того чтобы выяснить, каким образом эти компоненты связаны с распределением энергии в фотосинтетической мембране, проводили эксперименты, где состояние РЦ фотосистем изменялось при добавлении различных ингибиторов или путем варьирования интенсивности возбуждающего света. Перевод РЦ ФС II в закрытое состояние P^+IQ^- при добавлении диурона и освещении или при освещении с интенсивностью, насыщающей фотосинтез, вызывал увеличение значений τ_1 и τ_2 примерно в 1,5—3 раза. Тот же эффект достигался при химическом окислении РЦ и переводе их в закрытое состояние P^+IQ (рис. XXVII.10). Сопоставление со спектральным составом свечения этих компонентов показывает, что первый компонент характеризует в основном флуоресценцию ПБК ФС I ($\tau_1 \approx 80 \div 120$ пс, $\lambda_{\text{свеч}} > 700$ нм), а второй — преимущественно ПБК ФС II ($\tau_2 = 200 \div 500$ пс, $\lambda_{\text{свеч}} < 690$ нм). Характерно, что у мутантов зеленых водорослей, не содержащих ФС I, в кинетике затухания флуоресценции отсутствует компонент с τ_1 , а у мутантного штамма, не содержащего ни ФС I, ни ФС II, кинетика затухания флуоресценции близка к моноэкспоненциальной с $\tau = 2560$ пс.

Природа долгожившего компонента флуоресценции довольно сложна. Во-первых, молекулы хлорофилла, по тем или иным причинам не связанные с ФСЕ, обладают флуоресценцией с временем жизни, близким к τ флуоресценции растворов пигментов (5 нс). Во-вторых, попадание энергии возбуждения в закрытый реакционный центр PIQ^- вызывает восстановление первичного

акцептора и переход РЦ в состояние $P^+I^-Q^-$. Поскольку дальнейший перенос электрона от I^- на Q^- невозможен, будет происходить рекомбинация зарядов между P^+ и I^- с переводом P в возбужденное состояние P^* . В результате становится возможным перенос энергии от P^* обратно в светособирающую антенну с последующим испусканием флуоресценции. Возникающая замедленная флуоресценция с S_1 -уровня характеризуется увеличенным временем жизни, соответствующим времени рекомбинации разделенных зарядов в РЦ в состоянии $P^+I^-Q^-$.

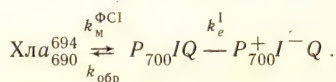
В хроматофорах пурпурных бактерий существуют два компонента флуоресценции: $\tau_1 = 50 \div 150$ пс и $\tau_2 = 10$ нс. Перевод РЦ в закрытое состояние путем химического или фотохимического окисления пигмента РЦ увеличивает τ_1 до 200—550 пс и практически не меняет величину τ_2 .

Выделение препаратов ПБК в нативном состоянии делает возможным непосредственное измерение величин τ и соответствующих констант миграции энергии. Выделенные в чистом виде препараты ССПБК с основным максимумом низкотемпературной флуоресценции при 680—681 нм, не содержащие ФС I и ФС II, характеризуются значением $\tau_{LH} \approx 2,5$ нс, которое близко к значению τ для разбавленных растворов пигментов. Следовательно, можно полагать, что сокращение τ флуоресценции пигментов в фотосинтезирующих организмах до 0,3 нс вызвано фотохимической дезактивацией в РЦ, а не бесполезным для фотосинтеза концентрационным тушением флуоресценции с переводом энергии в теплоту. Для выделенных частиц ФС II, включающих ССПБК + ПБК II РЦ ФС II, значения $\tau_{\text{ФС II}}$ составляли 450 пс, что отражает миграцию энергии от ССПБК на ФС II. Для целых хлоропластов (ССПБК + ПБК II РЦ ФС II + ПБК I РЦ ФС I) величина τ была еще меньше ($\tau_{\text{ФС II} + \text{ФС I}} \approx 350$ пс) вследствие одновременного тушения флуоресценции ССПБК обоими типами тушащих центров ФС II и ФС I. Легко показать, что

$$\begin{aligned} 1/\tau_{\text{ФС II}} - 1/\tau_{\text{ПБК}} &= k_{\text{м}}^{\text{II}}; \\ 1/\tau_{\text{ФС I} + \text{ФС II}} - 1/\tau_{\text{ПБК}} - k_{\text{м}}^{\text{II}} &= k_{\text{м}}^{\text{I}}, \end{aligned} \quad (\text{XXVII.4.3})$$

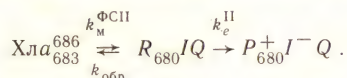
где $k_{\text{м}}^{\text{I}}$ и $k_{\text{м}}^{\text{II}}$ — константы скорости миграции энергии от ССПБК на ПБК ФС I и ПБК ФС II соответственно. Оценки по формуле (XXVII.4.3) показывают, что для хлоропластов с активными РЦ $k_{\text{м}}^{\text{II}}$ и $k_{\text{м}}^{\text{I}}$ составляют величины порядка $(1 \div 2) \cdot 10^9 \text{с}^{-1}$. Такие же значения $k_{\text{м}}^{\text{I}}$ получены на хлоропластах из мутантов гороха, лишенных РЦ ФС II, где $\tau_{\text{ПБК} + \text{ФС I}}$ также меньше $\tau_{\text{ПБК}}$ (1,3 и 2,5—3 нс соответственно).

Миграция энергии в ФС I и ФС II. Для выяснения роли отдельных форм Хла в флуоресценции ФС I регистрацию τ проводили при разных длинах волн свечения. Измерения температурной зависимости значений τ для препаратов ПБК I, обогащенных РЦ ФС I с отношением $P_{700}:\text{Хл} \approx 1:100$, показали следующее. Значения τ при комнатной температуре и 77 К в этих препаратах составляют 30 пс для $\lambda = 694$ нм, что соответствует скорости переноса возбуждения от Хла_{694}^{694} (см. рис. XXVII.8) на РЦ ФС I с константой $k_{\text{м}}\text{ПБК I} \approx 3 \cdot 10^{10} \text{с}^{-1}$. При понижении температуры значения τ и $k_{\text{м}}^{\text{ФС I}}$ константы скорости захвата возбуждения РЦ ФС I от Хла_{694}^{694} практически не менялись, однако они увеличивались до 60 пс при химическом окислении РЦ. Из величин τ_{694} и $k_{\text{м}}\text{ПБК I}$ можно оценить константу скорости разделения зарядов в РЦ ФС I:



Здесь $k_{обр} = k_m^{ФсI} e^{\Delta E / (k_B T)}$, где ΔE — энергия активации обратного переноса от P_{700} на $Хла_{690}^{694}$, соответствующая разности максимумов поглощения P_{700} и $Хла_{690}^{694}$ и равная $\sim 0,03$ эВ. Отсюда $k_{обр} \simeq 0,6 k_m^{ФсI}$. Учитывая, что квантовый выход разделения зарядов в РЦ ФС I близок к единице, можно оценить $k_e^I \simeq 10 k_{обр} = 10 \cdot 0,6 \cdot 3 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1} \simeq 1,8 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$, т. е. $\tau_{rc}^{ФсI} \simeq 5,6$ пс.

В других работах на частицах ФС I, где отношение $Хла:P_{700} \simeq 8 \div 10$, были найдены более короткие компоненты затухания флуоресценции в области 680 нм ($\tau \sim 70$ пс) и 694 нм ($\tau \simeq 10$ пс). Эти времена соответствуют переносу энергии от $Хла_{676}^{680}$ на донорную форму $Хла_{694}^{694}$ (70 пс) и далее от $Хла_{694}^{694}$ на P_{700} ФС I ($\simeq 10$ пс). Обнаруженный на этих препаратах третий долгоживущий компонент ($\tau = 3$ нс) может быть частично связан с замедленной флуоресценцией при рекомбинации зарядов в РЦ ФС I. В последнее время с помощью методов импульсной флуорометрии и абсорбционной спектроскопии одновременно выполнены прямые измерения скоростей разделения зарядов и переноса электрона в РЦ фотосистемы I. Установлено, что переход $P_{700}^* I Q \rightarrow P_{700}^+ I^- Q$ осуществляется за (7 ± 3) пс с константой скорости $k_e^I \simeq 1,4 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$. Перенос электрона от акцептора I к акцептору Q происходит за ~ 100 пс и с константой скорости $k \simeq 10^{10} \text{ с}^{-1}$. Аналогичные измерения длительности флуоресценции для ФС I позволяют также оценить значения констант в последовательности реакций:



Какова роль длинноволновых «зацентрированных» форм $Хла_{702}^{720}$ и $Хла_{712}^{740}$ в переносе энергии, дающих основной вклад в низкотемпературную длинноволновую полосу флуоресценции хлоропластов (рис. XXVII.11)? С понижением темпера-

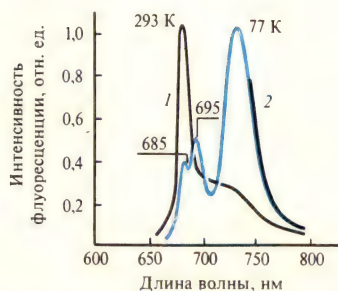


Рис. XXVII.11. Спектры флуоресценции хлоропластов при комнатной (1) и низкой (2) температурах
По оси ординат — относительная интенсивность флуоресценции

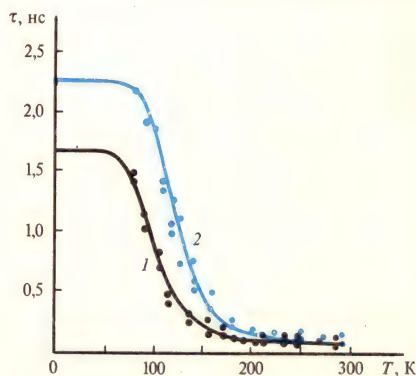


Рис. XXVII.12. Температурная зависимость τ флуоресценции при 720 нм (1) и 732 нм (2)

туры свечение при 735 нм характеризуется увеличением τ до значений 2,0—2,5 нс при 77 К. Возможно, что увеличение происходит в основном за счет долгоживущего компонента флуоресценции, вклад которого возрастает при понижении температуры.

Температурная зависимость τ флуоресценции при 720 и 732 нм приведена на рис. XXVII.12. Роль этих «зацентрированных» форм ($\text{Хл}a_{720}^{720}$ и $\text{Хл}a_{712}^{740}$), видимо, состоит в передаче возбуждения на РЦ ФС I с энергией активации переноса $\sim 0,05 \div 0,07$ эВ. При температуре ниже 180 К обнаруживается разгорание флуоресценции длинноволновых полос ($\tau_{\text{разг}} \approx 50 \div 150$ пс), которое отражает перенос энергии возбуждения от ПБК I на зацентрированные формы. На основании

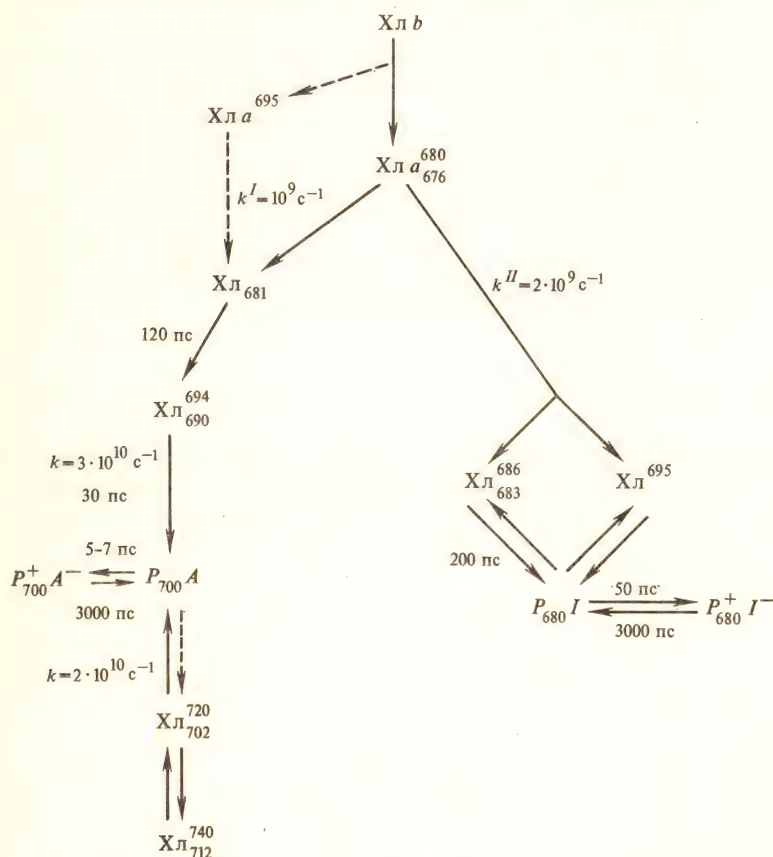


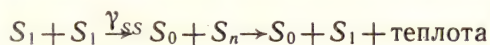
Рис. XXVII.13. Миграция энергии возбуждения в фотосинтетической мембране (на отдельных этапах миграции указаны времена (τ , пс) и константы (k , с^{-1}) переноса: $P_{700}A$ и $P_{680}I$ — компоненты реакционных центров фотосистем I и II).

приведенных выше данных можно составить схему миграции энергии, где указаны времена отдельных стадий переноса электронного возбуждения по пигментному аппарату в фотосинтетической мембране высших растений (рис. XXVII.13). При поглощении света энергия возбуждения, попадающая в общий резервуар ССПБК, направляется двумя потоками к ПБК I и ПБК II. Перенос энергии постепенно ускоряется по мере приближения к реакционным центрам ФС I и ФС II.

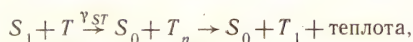
Как видно из значений констант переноса, миграция энергии между ССПБК и ПБК I и ПБК II осуществляется механизмами индуктивного резонанса (см. § 9 гл. XIII).

Миграция энергии в ССПБК. Исследование этого процесса проводят на основе нелинейного тушения флуоресценции при интенсивном лазерном возбуждении, когда концентрация возбужденных молекул в состоянии S_1 и T очень

велика. При этом происходит тушение флуоресценции с сокращением ее выхода и длительности за счет процессов бимолекулярной аннигиляции экситонов: синглет-синглетной



и синглет-триплетной



где S_0, S_1, T_1, T_n, S_n — основной, 1-й и n -й возбужденные синглетные и триплетные уровни молекулы хлорофилла; γ_{SS}, γ_{ST} — константы скорости $(S_1 + S_1) =$ и $(S_1 + T_1)$ -аннигиляций. Согласно § 11, гл. XIII, общее выражение для изменения плотности синглетных экситонов $n(t)$ имеет вид

$$dn/dt = J(t) - kn(t) - (1/2)\gamma_{SS}n^2(t), \quad (\text{XXVII.4.4})$$

где $k = 1/\tau_0$ — константа скорости дезактивации в отсутствие аннигиляции при низкой интенсивности возбуждения.

$$\gamma_{SS} = 8\pi DR; \quad L = (D\tau)^{1/2}; \quad W = DR^{-2}. \quad (\text{XXVII.4.5})$$

Здесь D — коэффициент диффузии, L — диффузионная длина, R — эффективный радиус взаимодействия экситонов, W — вероятность переноса возбуждения. Уравнение (XXVII.4.4) имеет решение, когда плотность экситонов в процес-

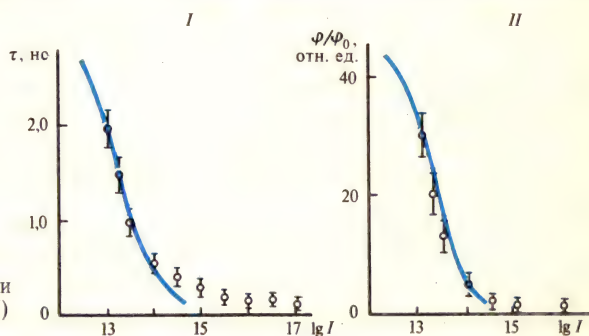


Рис. XXVII.14. Зависимость длительности $\tau(I)$ и выхода флуоресценции ϕ/ϕ_0 (II) от энергии импульса

се аннигиляции уменьшается равномерно по объему, а сами аннигиляционные процессы начинаются после установления равномерного возбуждения в пределах ССПБК, т. е. $\gamma_{SS}n \leq 1/\tau_{np}$, где τ_{np} — время скачка возбуждения. Можно получить выражение для уменьшения длительности (τ) и выхода (ϕ) флуоресценции при увеличении энергии возбуждающего импульса

$$\tau = \tau_0 \ln \{ [L + \gamma_{SS}n(0)/(2k)] / [1 + \gamma_{SS}n(0)/(2k)] \},$$

$$\phi/\phi_0 = \{ 2k / [\gamma_{SS}n(0)] \} \ln [1 + \gamma_{SS}n(0)/(2k)], \quad (\text{XXVII.4.6})$$

где $n(0) = \sigma NJ$ — число поглощенных фотонов, σ — сечение поглощения, N — число молекул в объеме, J — плотность энергии лазерного излучения. Сравнение экспериментальных (рис. XXVII.14) и теоретических зависимостей (XXVII.4.6) и (XXVII.4.5) позволяет найти значения констант:

$$\gamma_{ss} \simeq 5 \cdot 10^{-8} \text{ см}^3 \cdot \text{с}^{-1}; \quad D \simeq 2 \cdot 10^{-2} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}; \quad (\text{XXVII.4.7})$$

$$L \simeq 90 \text{ нм}; \quad W \simeq 10^{-12} \text{ с}^{-1}.$$

Большие значения γ_{ss} , D , L и W свидетельствуют в пользу экситонного механизма миграции энергии в пределах ПБК. Значительная длина диффузии в сочетании с высокой вероятностью переноса может обеспечить 5—6-кратное попадание экситона на РЦ за время жизни возбуждения, что, очевидно, необходимо для эффективного захвата и разделения зарядов в РЦ. Напомним, что



Рис. XXVII.15. Изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла при включении освещения

Величина f_0 соответствует флуоресцентным потерям энергии при полностью открытых центрах. Затем происходит возрастание флуоресценции до f_m и появление переменной флуоресценции f_v , равной в пределе $f_m - f_0$

собственное время жизни экситона в ССПБК без тушения РЦ приближается к 2,5—4 нс, что указывает на отсутствие других видов тушения возбуждения, кроме «фотосинтетического». Однако если в нормальной фотосинтетической мембране РЦ переходят в закрытое состояние, то значения длительности и выхода флуоресценции возрастают всего в 3—4 раза, т. е. остаются намного меньше значений этих же величин для растворов пигментов. Это означает, что и в закрытом состоянии РЦ продолжают тушить флуоресценцию, хотя и с меньшей эффективностью.

Рекомбинационное свечение. Одной из форм трансформации энергии в РЦ в закрытом состоянии может быть отмеченное выше возникновение рекомбинационной замедленной флуоресценции. В нормальных условиях восстановление вторичного акцептора Q при освещении светом и запуске потока электронов в ЭТЦ вызывает характерные изменения флуоресценции. На рис. XXVII.15 показана индукционная кривая увеличения выхода флуоресценции на стационарное состояние при постоянном освещении. Возрастание флуоресценции обусловлено переходом РЦ в закрытое состояние $P^+I^-Q^-$ при восстановлении акцептора Q . Существенный вклад в f_v дает рекомбинационная флуоресценция ($P^+I^-Q^- \rightarrow P^-IQ^- \rightarrow PIQ^- + h\nu$) наряду с обычной флуоресценцией антенны. Более медленные изменения флуоресценции наблюдаются в течение нескольких минут; они обусловлены перераспределением квантов между двумя фотосистемами (см. § 3, гл. XXVII). Большую роль здесь может играть спилловер, который увеличивается при восстановлении Q .

Таким образом, избыток квантов в ФС II в первые моменты освещения устраняется за счет преимущественного распределения потока из ССПБК на ФС I. Это достигается при установлении новой концентрации ионов (Mg^{2+}) и уровня фосфорилирования в стационарных условиях работы ЭТЦ. Другой механизм состоит в усилении прямого переноса $ФС II \rightarrow ФС I$ (спилловер), когда РЦ ФС II перегружены избытком квантов, эффективность захвата их РЦ ФС II уменьшается и они чаще переходят в ФС I.

§ 5. Реакционные центры пурпурных фотосинтезирующих бактерий

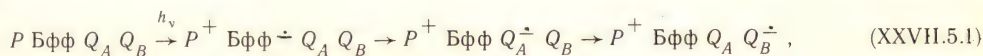
Первичный акт фотосинтеза, приводящий к разделению зарядов и восстановлению первичного акцептора, осуществляется в реакционных центрах. В настоящее время благодаря развитию методов препаративной биохимии удалось выделить в нативном состоянии РЦ фотосинтезирующих бактерий, который представляет собой отдельный пигмент-белковый комплекс.

Компоненты РЦ. РЦ пурпурных бактерий можно рассмотреть на примере хорошо изученных препаратов из *Rhodospseudomonas sphaeroides*, штамм R-26, содержащих три белковые субъединицы с молекулярной массой 19, 22 и $28 \cdot 10^3$. Их обозначают как L, M, H (легкая, средняя и тяжелая соответственно). Белок РЦ гидрофобен и нерастворим в воде в отсутствие детергента. Детергент переводит РЦ в водный раствор, делая гидрофильной поверхность белка, которую он покрывает. В состав РЦ входят четыре молекулы бактериохлорофилла (Бхл), две молекулы бактериофеофитина (Бфф), одна или две молекулы убихинона (Q), атом железа (Fe).

Природа первичного фотохимического акта была выяснена в работах Л. Н. М. Дюйзенса, который обнаружил небольшие обратимые изменения поглощения (ΔA) при освещении хроматофоров *Rhodospirillum rubrum*. Эти изменения характеризовались выцветанием полосы поглощения при 870 нм и сдвигом в синюю область полосы при 800 нм. Подобные небольшие (около 2%) изменения поглощения были получены и при химическом окислении РЦ. Это указывает на окисление под действием света небольшой части активного Бхл, принадлежащего РЦ, которая составляет лишь около 2% от общего содержания Бхл и представляет собой реакционноспособный пигмент P_{870} . Фотоокисление P_{870} происходит с квантовой эффективностью, достигающей 100%, и осуществляется также с большой квантовой эффективностью при 1 К. На рис. XXVII.16, А приведен спектр поглощения препаратов РЦ бескаротиноидного штамма бактерий *R. sphaeroides*, R-26, на котором обозначены максимумы поглощения, принадлежащие пигментам Бхл и Бфф. При поглощении света происходит выцветание полос при 870, 600 нм и сдвиг в синюю область полосы 800 нм, принадлежащих P_{870} , с одновременным появлением новой полосы поглощения около 1250 нм.

На рис. XXVII.16, Б приведены дифференциальные спектры поглощения (свет минус темнота) при образовании P^+ с положительными максимумами 435, 1250 нм и отрицательными максимумами, соответствующими выцветанию полос поглощения при 600, 870 нм, а также сдвигу и выцветанию полосы при 800 нм. Все эти изменения характерны для образования катион-радикала димера фотоактивного Бхл $^+$. Выцветание полос при 545 и 760 нм свидетельствует о превращении Бфф, а положительный максимум при 670 нм — о появлении при этом анион-радикала Бфф $^-$. Кроме того, увеличение поглощения при 670 нм характерно также и для анион-радикала Бхл. Выцветание полосы при 275 нм обусловлено образованием восстановленного убихинона и образованием убисемихинона. После выключения света эти спектральные изменения исчезают, что вызвано рекомбинацией между P^+ и Q^- .

При использовании спектральных эффектов установили последовательность прямых реакций переноса электрона между указанными компонентами РЦ:



где P — диаметр бактериохлорофилла, Q_A , Q_B — первичный и вторичный акцепторы хинонной природы (убихиноны). Поскольку переносчики обладают раз-

ными окислительно-восстановительными потенциалами, можно проверить справедливость схемы (XXVII.5.1). Для этого предварительно в темноте с помощью окислительно-восстановительного титрования приготавливают РЦ в исходном состоянии с восстановленными $Q_A^- Q_B^-$ т. е. РБфф $Q_A^- Q_B^-$. Тогда освещение РЦ

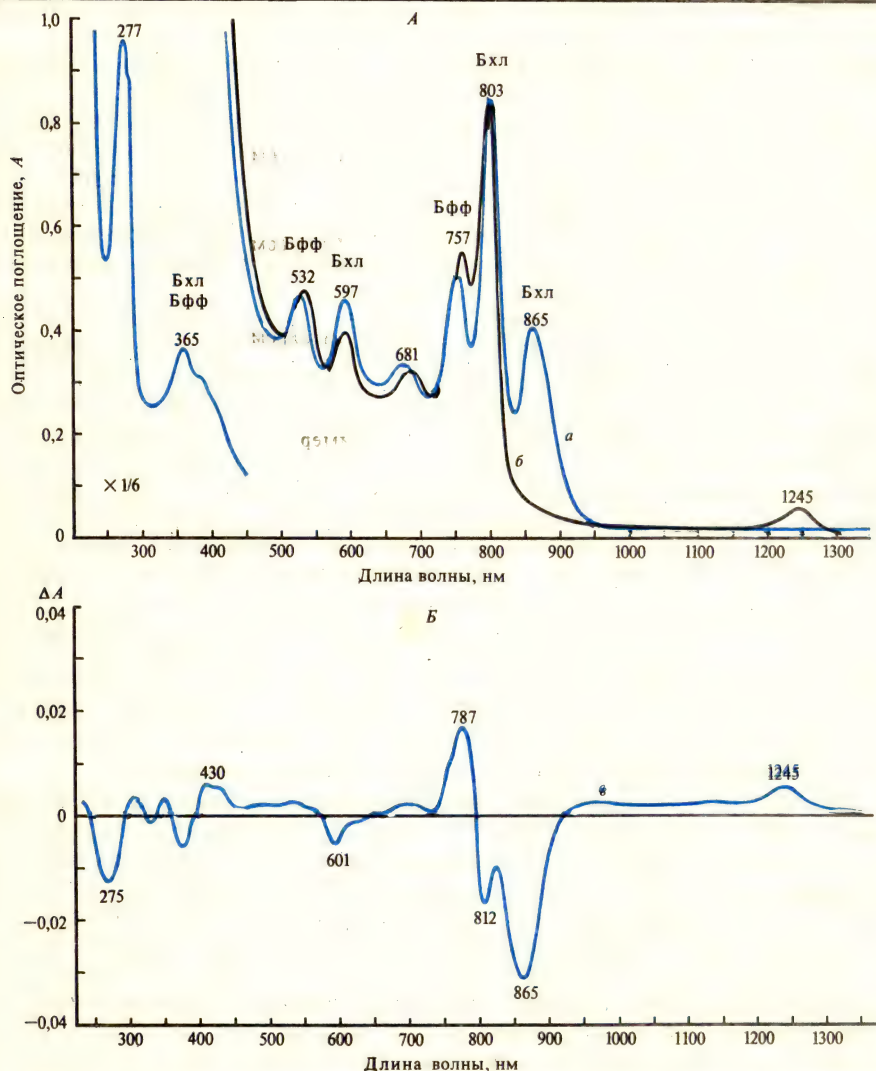


Рис. XXVII.16. Спектр поглощения (А) реакционных центров (РЦ) и дифференциальный спектр поглощения (свет минус темнота) (В):

a —спектр РЦ в темноте, b —спектр освещенных РЦ, e —разность между a и b

Полосы спектра поглощения (А) в диапазоне длин волн короче 450 нм имеют очень большую амплитуду, поэтому на рисунке показаны в шестикратном уменьшении

в присутствии соответствующих доноров электрона, которые восстанавливают Р, будет приводить к накоплению состояния РБфф $Q_A^- Q_B^-$. Затем измеряют дифференциальные спектры свет — темнота состояний РБфф $Q_A^- Q_B^-$ и РБфф

$Q_A^-Q_B^-$. Таким путем удалось окончательно установить, что Бфф является промежуточным переносчиком, передающим электроны непосредственно на Q_A . Приведенный на рис. XXVII.16,Б дифференциальный спектр образования Бфф соответствует разности состояний $PБфф - Q_A^-Q_B^-$ и $PБффQ_A^-Q_B^-$.

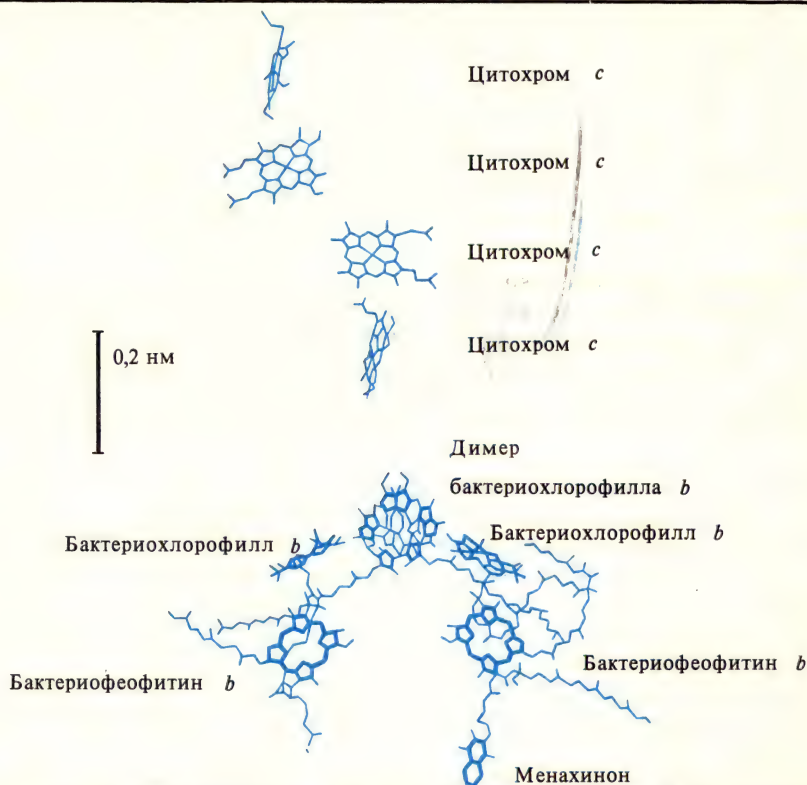


Рис. XXVII.17. Структура фотосинтетического реакционного центра бактерий *Rhodospseudomonas viridis*

Большинство экспериментальных данных свидетельствует в пользу того, что P_{870} представляет собой димер $(Бхл)_2$, в котором в состоянии P^+ оставшийся неспаренный электрон обобществлен. Одноэлектронное окисление P приводит к появлению сигнала ЭПР, у которого g -фактор равен 2,0025, так же как и для катион-радикала $Бхл^+$. Однако для P^+ ширина линии сигнала ЭПР составляет $\Delta H = 0,94$ мТл, что в $\sqrt{2}$ раза уже, чем для мономерного катиона $Бхл^+$ ($\Delta H = 1,2$ мТл). Так как сужение линии пропорционально \sqrt{n} , где n — число молекул, обобществляющих неспаренный электрон, то в данном случае $n=2$, т. е. P является диатомом $(Бхл)_2$. Величина $E_{1/2}$ пары P/P^+ составляет около $+450$ мВ и не зависит от рН среды, т. е. отрыв электрона от P не сопровождается протонированием.

Первичный хинон (Q_A) — одноэлектронный переносчик, хотя в восстановительных условиях он присоединяет два электрона. Вторичный хинон (Q_B) в отличие от Q_A в обычных условиях может функционировать как двухэлектронный переносчик. Fe входит в состав комплекса Q_AQ_B , который можно схематически представить как Q_AFeQ_B . Измерение спектров эффекта Мёссбауэра показало, что Fe не меняют свою валентность и остается в высокоспиновом (Fe^{2+}) состоя-

нии независимо от переноса электрона в акцепторном хинонном комплексе. Однако удаление Fe нарушает перенос электрона между Q_A и Q_B . Очевидно, сам атом железа не является акцептором электрона, а только облегчает его перенос между первичным и вторичным хинонами.

В последнее время благодаря успехам в получении кристаллических препаратов белков фотосинтетических РЦ пурпурных бактерий удалось расшифровать трехмерную структуру расположения компонентов РЦ (рис. XXVII.17).

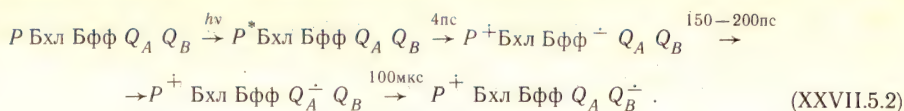
Белок РЦ из *R. viridis* был, по существу, одним из первых гидрофобных белков, который удалось кристаллизовать и подвергнуть рентгеноструктурному анализу. Сейчас уже опубликованы первые сообщения об успешной кристаллизации белков РЦ из других фотосинтезирующих организмов, в частности из *R. sphaeroides*, R-26, на которых выполнено подавляющее большинство кинетических и других функциональных измерений первичных процессов фотосинтеза.

Перенос электрона в РЦ. Кинетика электронного транспорта в РЦ пурпурных бактерий была детально расшифрована с помощью методов наносекундной (10^{-9} с) и пикосекундной (10^{-12} с) абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Возбуждение РЦ лазерным импульсом индуцирует характерные абсорбционные изменения (см. рис. XXVII.16), времена нарастания и исчезновения которых соответствуют переносу электрона между отдельными компонентами РЦ.

Поглощение света фотохимически активным пигментом P переводит его на синглетный возбужденный уровень $^1P^*$, с которого происходит отрыв электрона. Этот процесс завершается за время короче 10 пс и сопровождается выцветанием полосы P (870 нм), выцветанием полос Бфф (545, 760 нм) и одновременным появлением полосы Бфф (670 нм). Таким образом, в результате возбуждения световым импульсом в РЦ образуется состояние, которое включает радикальную пару P^+ и Bff^- с разделенными зарядами и локализацией электрона на Бфф: $P^+ Bff^-$. С применением субпикосекундных (0,7 пс) вспышек показано, что время нарастания изменений поглощения Бфф при 545 и 670 нм составляет около 4 пс.

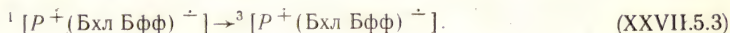
Регистрация спектров с более высоким разрешением ($t \leq 1$ пс после вспышки) обнаруживает отличающийся от описанного выше спектр, включающий изменения поглощения при 800 нм. На основании этого высказано предположение об участии промежуточного переносчика электронов между P^* и Бфф — молекулы Бхл, поглощающей при 800 нм. Однако детальный анализ спектральных эффектов, возникающих при избыточной фотоактивации РЦ (под действием мощных лазерных вспышек) и зависящих от направления поляризации возбуждающего и зондирующего света, а также учет вклада других состояний РЦ не подтвердили существование достоверных различий между спектрами, зарегистрированными непосредственно и через 30 пс после вспышки. Таким образом, вопрос об участии Бхл₈₀₀ в переносе электрона в РЦ между P и Бфф является спорным. Окончательное его решение, видимо, требует применения фемтосекундной спектральной аппаратуры.

В настоящее время принято считать, что образующееся за 4—7 пс первичное состояние РЦ с разделенными зарядами (P^+I^-) представляет собой смесь состояний P Бхл и P Бфф, находящихся в равновесии, причем не менее ~60% электронной плотности неспаренного электрона локализуется на Бфф. Через 150—200 пс после образования Бфф⁻ восстанавливается первичный хинон Q_A , который далее отдает электрон на Q_B уже за время $\approx 10^{-4}$ с. Таким образом, прямые реакции переноса электрона и их времена в РЦ можно представить как

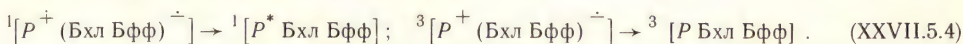


Кинетика затухания флуоресценции P^* в РЦ характеризуется средним временем $\tau \sim 10$ пс (рис. XXVII.18). Так как квантовый выход окисления P порядка 100%, то в (XXVII.1.8) — (XXVII.1.10) $k_f \gg k$ и $\Phi \gg B$. Это означает, что время затухания флуоресценции в (XXVII.1.5) $\tau \sim 10$ пс соответствует величине $1/k_f$ (XXVII.1.5) или времени отрыва электрона от P^* с образованием P^+ (Бхл Бфф) $^-$.

Если перед возбуждением восстановить Q_A химическим путем, т. е. перевести РЦ в состояние $[P \text{ Бхл Бфф } Q_A^-]$, то образующееся под действием света состояние $[P^+ \text{ Бхл Бфф } Q_A^-]$ живет намного дольше (до ~ 10 нс). Очевидно, в этих условиях Бфф $^-$ не может отдать электрон на Q_A^- и распад состояния $[P^+ \text{ Бхл Бфф } Q_A^-]$ должен осуществляться другими путями. Действительно, в спектре фотоиндуцированных изменений состояния $[P^+ \text{ Бхл Бфф } Q_A^-]$ с течением времени возникают спектральные полосы нового типа, свойственные триплетному состоянию фотоактивного димера бактериохлорофилла 3P (или 3P). Анализ показывает, что в данном случае триплетное состояние (3P) образуется не в результате непосредственного перехода из синглетного возбужденного состояния ($^1P^*$). Оно появляется вследствие конверсии спинов за время существования радикальной пары $[P^+ (\text{Бхл Бфф})^-]$ при переходе спинов неспаренных электронов на P^+ и Бфф $^-$ в параллельную триплетную ориентацию:



Если в темноте исходно восстановить Бфф и химически перевести РЦ в состояние $[P \text{ Бхл Бфф } Q_A^-]$, то при освещении триплетное состояние уже не образуется. Это также доказывает, что триплеты появляются в ходе рекомбинации P^+ и Бфф $^-$ в радикальной паре. Таким образом, в состоянии $[P^+ (\text{Бхл Бфф})^-]$ возможны два пути рекомбинации радикалов P^+ и Бфф $^-$:



Появление P^* в ходе реакций в состоянии $[P^+ (\text{Бхл Бфф})^-]$ является причиной увеличения флуоресценции, когда перенос электрона от Бфф на Q_A^- блокирован.

Выход триплетных молекул 3P увеличивается от 10—20% при комнатной температуре до 90—100% при 20 К, причем при комнатной температуре он понижается в 1,5—2 раза при действии внешнего магнитного поля ($H \sim 0,1$ — $0,2$ мТл). Существуют различные механизмы, вызывающие переориентацию спинов в радикальной паре и переход ее в триплетное состояние. Основную роль играют здесь дипольные магнитные взаимодействия между электронами (спин-спиновый обмен). Значение обменного спин-спинового интеграла (I) определяет расщепление синглетного и триплетного уровней радикальной пары

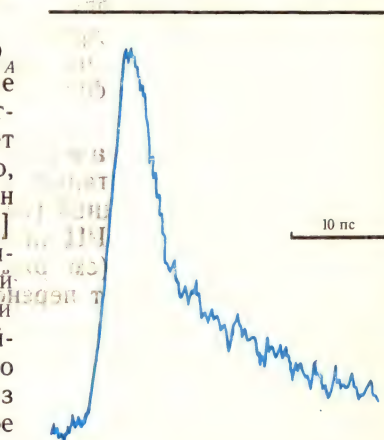


Рис. XXVII.18. Кинетика затухания флуоресценции препаратов реакционных центров, характеризующаяся средним временем затухания $\tau \sim 10$ пс

$[P^+(\text{Бхл Бфф}^-)]$ на величину энергетического зазора между синглетным и триплетным состояниями $^1[P^+(\text{Бхл Бфф}^-)]$ и $^3[P^+(\text{Бхл Бфф}^-)]$.

Величина I задается выражением

$$I = 2e^2 I_{int} / (\Delta E)^2, \quad (\text{XXVII. 5.5})$$

где ΔE — разность энергетических уровней состояний $[P^*\text{Бхл Бфф}]$ и $[P^+(\text{Бхл Бфф}^-)]$; I_{int} — величина энергетического расщепления синглетного и триплет-

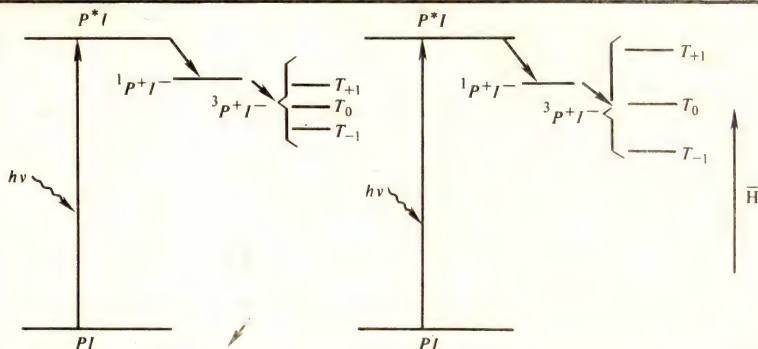


Рис. XXVII.19. Энергетические уровни радикальной пары в отсутствие внешнего магнитного поля (А) и во внешнем магнитном поле (Б)

Расстояние между подуровнями определяется величиной энергии Зеемана $g\beta H$, где β — магнетон Бора [см. (X. 2.15)]. При достаточно больших значениях H подуровни T_{+1} и T_{-1} настолько расходятся, что только один уровень T_0 остается близким к синглетному уровню для обеспечения $S \rightarrow T$ -перехода. В этом случае заселенность состояний $^3[P^+(\text{БхлБфф}^-) - Q_A]$ падает, что проявляется в уменьшении выхода образования триплетных молекул 3P при действии внешнего магнитного поля

ного уровней, димера бактериохлорофилла P ; ε^2 — интервал перекрыwania волновых функций состояний $[P^*\text{Бхл Бфф}]$ и $[P^+(\text{Бхл Бфф}^-)]$, определяющий эффективность туннельного переноса электрона с образованием радикальной пары (см. § 3, гл. XIII). Таким образом, величина I связана с константой скорости k туннельного переноса электрона от P^* на Бфф. Значение константы скорости переноса электрона между P^* и Бфф равно величине, обратной времени разделения зарядов $k = 1/\tau$ ($\tau \sim 5 \cdot 10^{-12}$ с), и составляет $k \sim 2 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$. Отсюда можно приблизительно оценить $\varepsilon^2 \sim 2000 \text{ см}^{-2}$. Принимая, что $I_{int} \sim 2500 \text{ см}^{-1}$, $\Delta E \sim 3000 \text{ см}^{-1}$, находим из (XXVII.5.5) величину обменного спин-спинового взаимодействия, которая должна составить $I = 1 \text{ см}^{-1}$. Однако на расстояниях 0,9—1,0 нм между молекулами P и Бфф значения I , определенные экспериментально, в действительности на три порядка меньше и не превышают 10^{-3} см^{-1} .

Очевидно большая величина обменного взаимодействия, необходимая для обеспечения высокой константы скорости переноса электрона, характеризует обменное взаимодействие на меньших расстояниях в промежуточном положении между P^+ и (Бхл Бфф^-) . Это положение электрон занимает в комплексе $[P^+(\text{БхлБфф}^-)]$, частично локализуясь на Бхл.

Эффективное смещение синглетных и триплетных состояний обеспечивается малой величиной энергетического зазора между ними. Если за время существования радикальной пары произойдет обращение спина электрона, то осуществляется переход $S \rightarrow T$ на один из подуровней триплетного состояния. В ну-

левом магнитном поле энергетическое расщепление между подуровнями радикальных пар весьма мало и переход происходит на любой из трех подуровней T_{+1} , T_0 , T_{-1} . Однако во внешнем магнитном поле триплетные уровни радикальной пары расщепляются на три подуровня T_{+1} , T_0 , T_{-1} в соответствии со значением спинового квантового числа $m_s = 0, \pm 1$ (см. § 1, гл. XII), определяющего величины проекций суммарного магнитного момента электронов на направление внешнего поля **H** (рис. XXVII.19).

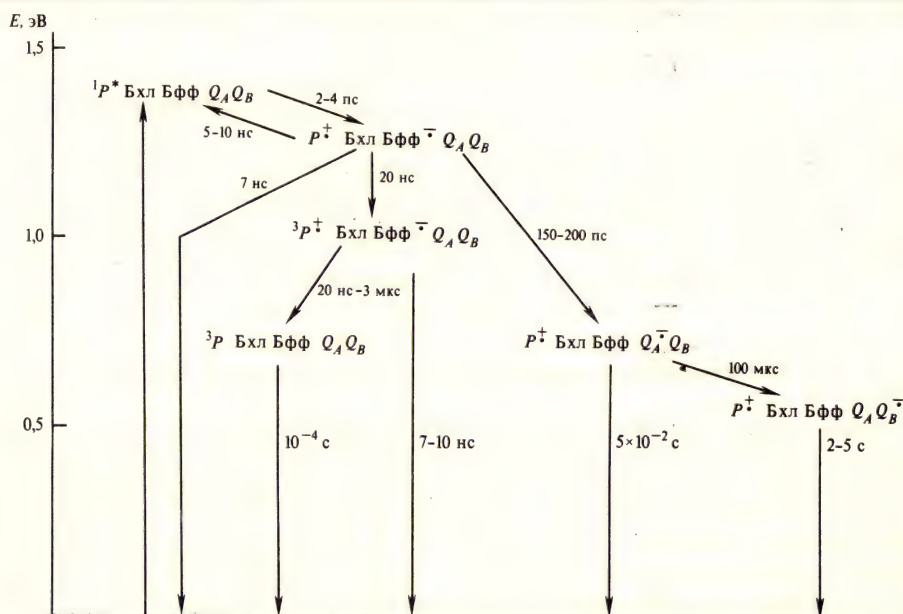


Рис. XXVII.20. Перенос электрона в реакционных центрах пурпурных бактерий

Рекомбинация зарядов в радикальной паре, находящейся в синглетном состоянии $[P^+ (Bhl Bff)^-]$, приводит к переходу ее в основное $[P Bhl Bff]$ либо возбужденное $[P^* Bhl Bff]$ состояние. В последнем случае рекомбинация сопровождается появлением замедленной флуоресценции с временем жизни в несколько наносекунд (в обычных условиях, когда Q_A окислен, квантовый выход флуоресценции РЦ составляет всего 0,03—0,04%). Восстановление Q_A в темноте приводит к повышению выхода свечения до 0,12—0,15% в основном за счет увеличения замедленной флуоресценции. Понижение температуры уменьшает выход рекомбинационного свечения. Наоборот, действие внешнего магнитного поля, замедляющего переход $S \rightarrow T$ и тем самым увеличивающего заселенность синглетного состояния радикальной пары, увеличивает выход рекомбинационного свечения до 3—5% при напряженностях **H** от 10 до 50 мТл.

На рис. XXVII.20 представлена схема переноса электрона в РЦ пурпурных бактерий. Как видно, прямые реакции переноса электрона по направлению $P \rightarrow (Bhl, Bff) \rightarrow Q_B$ происходят за времена намного короче, чем времена обратных реакций рекомбинаций или диссипаций соответствующих промежуточных состояний. В этом состоит принцип кинетической организации переноса электрона, согласно которому высокая эффективность функционирования РЦ обеспечивается тем, что на каждом участке цепи прямые реакции идут на 2—3

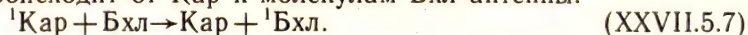
порядка скорее, чем обратные, ведущие к снижению общего квантового выхода первичных стадий электронного транспорта.

Следует еще раз подчеркнуть, что триплетные состояния бактериохлорофилла в РЦ выявляются лишь когда Q_A исходно восстановлен в темноте, а прямой перенос электрона затруднен. В том случае, когда P_{890} исходно окислен химически, возбуждение не тушится в РЦ и остается в антенне. В результате триплетные состояния Бхл в РЦ отсутствуют, но вместо них появляются триплетные состояния Бхл в антенне.

В присутствии каротионидов (Кар) происходит миграция энергии триплетного состояния за 20 нс на 1 молекулу Кар:



Этот процесс идет намного быстрее, чем реакция триплетных молекул Бхл с кислородом (10^{-4} с), которая может приводить к деструкции фотосинтетической мембраны на свету за счет образования при этом активного окислителя — синглетного кислорода (см. § 4 гл. XIV). Тем самым каротиноиды выполняют защитную функцию, предохраняя компоненты мембраны от фотоокисления. Миграция энергии синглетного состояния, которое в отличие от триплетного у Кар лежит выше, чем у Бхл, происходит от Кар к молекулам Бхл антенны:



§ 6. Реакционные центры фотосистемы I зеленых растений

Первичный донор электрона в РЦ ФС I был открыт Б. Коком (1956) по выцветанию полосы поглощения при 700 нм. Дифференциальный спектр поглощения (свет — темнота) хлоропластов характеризуется выцветанием полос Хл a при 430 и 700 нм (рис. XXVII.21), которое индуцируется как при освещении, так и при химическом окислении. Следовательно, в наблюдаемой реакции происходит окисление фотохимически активного хлорофилла (P_{700}). Потенциал $E_{1/2}$ пары P_{700}/P_{700}^+ лежит в пределах $E_{1/2} \simeq 400 \div 500$ мВ. При окислении P_{700} возникает сигнал ЭПР с фактором $g = 2,0026$. Ширина сигнала ЭПР P_{700} приблизительно в $\sqrt{2}$ раз уже, чем ширина сигнала катион-радикала Хл a^+ в растворе. Это свидетельствует в пользу того, что P_{700} может представлять собой, видимо, димер Хл a , в котором электронная плотность делокализуется между двумя молекулами хлорофилла при образовании P_{700} .

Анализ фотоиндуцированных изменений поглощения в области 430 нм позволил установить, что акцепторами электрона в РЦ ФС I являются железосерные центры (Fe — S) типа ферредоксина. Соответствующий этому компоненту сигнал ЭПР, измеренный при криогенных температурах, представляет собой сумму сигналов, принадлежащих двум железосерным центрам (центры A и B), с потенциалами $E_{1/2} \simeq 530 \div 553$ мВ (A) и $E_{1/2} \simeq 580 \div 594$ мВ (B) и разными значениями g -фактора. Добавление в среду ферредоксина и НАДФ $^+$ уменьшает сигналы от восстановленных центров A и B, которые вместе называют P_{430} . При слабом освещении в основном восстанавливается центр A, а затем при увеличении потока электронов наблюдается восстановление центра B, имеющего более отрицательные значения $E_{1/2}$. Однако центры A и B не являются первичными акцепторами электронов. Если центры A и B предварительно восстановить в темноте химическим путем, то последующее освещение вызывает обратимое окисление P_{700} , идущее и при низких температурах. Возникающий при этом новый сигнал ЭПР принадлежит центру X (или A_2) ($E_{1/2} \simeq -705$ мВ). Очевидно, акцептор X передает электроны на центр A, а затем и на центр B, причем центры A и B могут функционировать как последовательно, так и параллельно:

$P_{700} \rightarrow X \rightarrow (A, B) \rightarrow \text{ферредоксин} \rightarrow \text{НАДФ}^+ \rightarrow \text{циклический транспорт. (XXVII.6.1)}$

Полагают, что A и B вместе представляют собой белковый 8 Fe, 8 S-кластер, включающий два близко расположенных 4Fe — 4S-центра. Заметим, что растворимый ферредоксин представляет собой белок типа 2Fe — 2S.

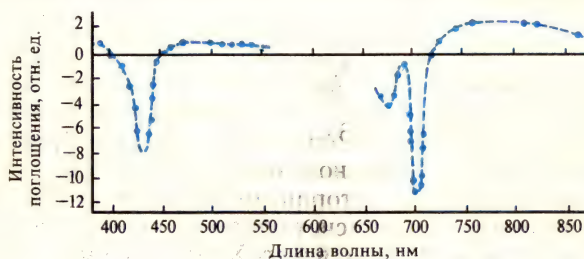


Рис. XXVII.21. Дифференциальный спектр (свет минус темнота) для субхлоропластных частиц, содержащих фотосистему I

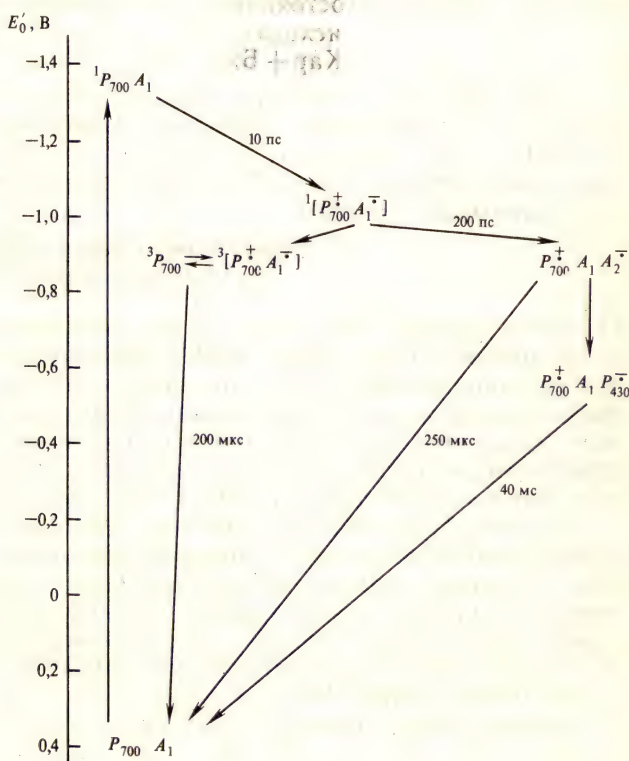
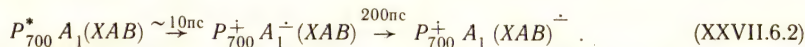


Рис. XXVII.22. Перенос электрона в реакционном центре фотосистемы I

Наиболее близкий к хлорофиллу РЦ акцептор (A_1) из всех известных акцепторов электрона в ФС I обнаруживается при исследовании обратимого окисления P_{700} под действием коротких вспышек света. За время ~ 10 пс под действием лазерной вспышки образуется состояние $^1[P_{700}^+ \text{Хл}_{695}^-]$, где Хл_{695} — акцептор хлорофильной природы (A_1). Через 200 пс это состояние переходит в состояние $[P_{700}^+ A_1 (\text{FeS})^-]$. В условиях, когда железосерные центры X , A , B восстановлены в темноте, оптические изменения P_{700} и сигнал ЭПР, возникаю-

щие под действием лазерной вспышки, затухают по двухфазной кривой. Времена затухания двух компонентов ($\tau_{1/2} = 3 \div 5$ нс и $\tau_2 = 3$ мкс) характеризуют соответственно рекомбинацию $[(P_{700}^{\pm}A_1^{\pm})]$ и время жизни триплетного состояния ${}^3[P_{700}^{\pm}A_1^{\pm}]$, примешанного к триплетному состоянию ${}^3P_{700}$.

Таким образом, последовательность переноса электрона в ФС I имеет вид



Восстановление P_{700} происходит в цепи цит $f \rightarrow$ пластоцианин $\rightarrow P_{700}^{\pm}$ за время ≈ 200 мкс, а также частично непосредственно от цит f (цит $f \rightarrow P_{700}^{\pm}$) за 15 мкс (см. рис. XXVII.2). Общая схема переноса электрона и рекомбинационных процессов в ФС I приведена на рис. XXVII.22.

Аналогично РЦ пурпурных бактерий, в РЦ ФС I происходит образование триплетных и синглетных состояний радикальной пары $[P_{700}^{\pm}A_1^{\pm}]$. После восстановления в темноте железосерного белкового комплекса (XAB), последующее освещение вызывает проявление замедленной люминесценции (0,1—0,2 мкс) в результате рекомбинации зарядов в радикальной паре:

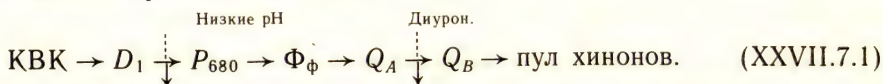


При действии магнитного поля переходы $S \rightarrow T$ в радикальной паре затрудняются и в результате возрастает заселенность синглетного состояния ${}^1[P_{700}^{\pm}A_1^{\pm}]$. Как следствие, происходит усиление замедленной рекомбинационной люминесценции в РЦ и увеличение флуоресценции ближайших к РЦ молекул хлорофилла антенны.

§ 7. Реакционные центры фотосистемы II зеленых растений

Основная функция РЦ ФС II состоит в акцептировании электронов от кислородвыделяющего комплекса (КВК) и дальнейшей передаче их в цепь переносчиков по направлению в ФС I. Первичным донором электрона в ФС II является фотоактивный пигмент P_{680} , названный так по аналогии с P_{700} . Освещение вызывает выцветание полосы при 680—690 нм и некоторое увеличение поглощения при 820 нм, характерное для катион-радикала хлорофилла. Характер возникающего сигнала ЭПР указывает на то, что P_{680}^{\pm} может представлять собой димер хлорофилла. Поскольку P_{680} окисляет молекулу воды, его окислительно-восстановительный потенциал $E_{1/2}$ должен превышать $+810$ мВ. Это означает, что P_{680}^{\pm} — сильный окислитель, который может окислять соседние молекулы пигментов, если восстанавливающий его «нормальный» донор в цепи не имеет электронов. Именно поэтому исследования P_{680}^{\pm} затруднены, так как накопить P_{680}^{\pm} в достаточном количестве можно только в сильно окислительных условиях и при ингибировании КВК.

Общая схема переноса имеет вид



Как видно, восстановление P_{680}^{\pm} обеспечивается вторичным донором D_1 , который получает электроны от КВК.

В акцепторной части молекулы хинонов Q_A , Q_B представляют собой пластохиноны. Перенос электрона между первичным и вторичным пластохинонами Q_A и Q_B блокируется диуроном, действием низкой температуры. При низких значениях pH и пониженных температурах прерывается восстановление P_{680}^{\pm} от донора D_1 . Одним из методов исследования реакций, протекающих в

ФС II, является регистрация флуоресценции Хл *a* антенны, зависящей от состояния РЦ ФС II. Очевидно, тушение флуоресценции должно происходить в состоянии $P_{680}Q_A^+$, когда центр открыт (см. § 4 гл. XXVII). Восстановление Q_A^- переводит центры в закрытое состояние $P_{680}Q_A^-$, где тушение флуоресценции ослаблено и соответственно ее интенсивность возрастает.

Однако тушение флуоресценции происходит и в том случае, когда центры находятся в закрытом состоянии P_{680}^+ , где фотоактивный пигмент окислен. Причина этого состоит в том, что спектр поглощения катион-радикала $Хл a^+$ обладает широкой полосой в красной и ближней инфракрасной областях (600—850 нм). Это обеспечивает резонансный перенос (см. § 9 гл. XIII) энергии возбуждения от молекул антенны на $Хл a^+$ (P_{680}^+), перевод его на нижний возбужденный электронный уровень около 820 нм с последующей деградацией энергии, не связанной уже с фотосинтезом. Таким образом, увеличение выхода флуоресценции антенны происходит только в состоянии $P_{680}Q_A^-$. Если затем Q_A^- отдает электрон на Q_B , а P_{680} остается в восстановленной форме ($P_{680}Q_A^-Q_B \rightarrow P_{680}Q_AQ_B^-$), то флуоресценция уменьшается.

Кинетику переноса электрона в ФС II исследовали с помощью флуоресцентных методов в условиях действия ингибиторов (диурон, низкий рН среды) и с помощью измерения флуоресценции после каждой вспышки света при действии серии последовательных вспышек. Так, давая последовательные вспышки света и варьируя темновой интервал между ним, можно измерить время, необходимое для переноса электрона от Q_A на Q_B . Кинетику появления и исчезновения P_{680}^+ измеряли непосредственно в максимуме поглощения при 680 или 820 нм. В результате установлены времена переноса в цепи в физиологических условиях:



Восстановление первичного пластохинона Q_A в опытах с двумя последовательными вспышками регистрировали по изменению поглощения при 320 нм. Было установлено, что понижение температуры или действие диурона приводит к замедлению переноса электрона на пластохинон. Как и в пурпурных бактериях, эта реакция сопровождается другими изменениями поглощения, в частности при 550 нм (эффект С-550). Этот эффект представляет собой электрохромный сдвиг полосы поглощения, β -каротина и является индикатором восстановления Q_A , подобно тому, как в РЦ пурпурных бактерий восстановление Q_A сопровождается электрохромным сдвигом полосы поглощения бактериофеофитина.

В последнее время появились данные о гетерогенном характере первичного акцептора Q_A . В присутствии диурона, когда не происходит повторного окисления Q_A за счет дальнейшего переноса электрона на Q_B , выход флуоресценции является мерой общего количества фотовосстанавливающихся молекул Q_A . Обычно кинетика фотовосстановления носит двухфазный характер: быстрая (α) и медленная (β) экспоненциальные фазы, регистрируемые по индукционной кривой нарастания флуоресценции. Если перед освещением препараты инкубировать при определенном значении окислительно-восстановительного потенциала среды, то последующее фотоиндуцированное увеличение флуоресценции будет тем меньше, чем больше молекул Q_A химически восстановлено в темноте. Кривая окислительно-восстановительного титрования флуоресценции хлоропластов в присутствии диурона имеет явно выраженный двухфазный характер с двумя компонентами: $E_{1/2} \approx -250$ мВ (Q_A^L) и $E_{1/2} \approx 0$ мВ (Q_A^H). Быстрая α -фаза восстановления Q_A соответствует высокопотенциальному Q_A^H , а более медленная β -фаза — низкопотенциальному

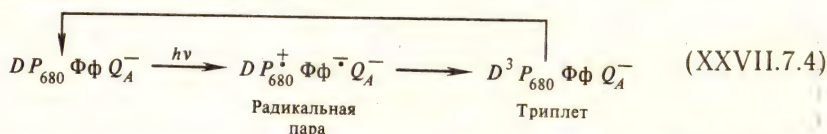
Q_A^L . Предполагают наличие двух типов фотосистем: ФС II_α и ФС II_β, возможно, локализованных в разных частях тилакоида.

Большое внимание уделяют изучению природы первичного акцептора, расположенного между P_{680} и первичным пластохиноном. Оказалось, что дифференциальные спектры фотоиндуцированных изменений поглощения субхлоропластных фрагментов, обогащенных ФС II и измеренных в восстановительных условиях, соответствуют спектру фотовосстановления феофитина (Фф). Выцветание полос поглощения при 408—410, 422—428, 685 нм, а также полос 518 и 545 нм, появление широких полос при 450 и 650 нм, узкой полосы при 675 нм характерны для появления Фф в реакции:



Измерение кинетики затухания флуоресценции ФС II после пикосекундных импульсов у образцов с исходно восстановленными Q_A показало два компонента: короткоживущий (≈ 320 пс) и долгоживущий (≈ 3 нс). При накоплении фотовосстановленного Фф остается только короткоживущий компонент, время жизни которого уменьшается от 320 до 150 пс, а долгоживущий (4 нс) компонент исчезает. Очевидно, переменная флуоресценция, проявляющаяся в виде возрастания свечения при восстановлении Q_A , включает в себя рекомбинационное свечение ($\tau \sim 3$ нс), которое является следствием рекомбинации зарядов в $[P_{680}^+ \Phi\phi^-] Q_A^-$. При длительном освещении накапливается долгоживущее состояние $[P_{680} \Phi\phi^-] Q_A^-$. Обнаружен компонент флуоресценции, интенсивность которой возрастала под влиянием магнитного поля аналогично ФС I (см. § 5, 6 гл. XXVII).

С помощью метода ЭПР при температуре жидкого Не был обнаружен сигнал, соответствующий триплетному состоянию $^3P_{680}$. Так же как и в препаратах бактериальных РЦ, триплетный сигнал появляется только при освещении РЦ, у которых в темноте исходно восстановлен первичный пластохинон. Если в исходном состоянии перед освещением Фф находился в восстановленном состоянии, то амплитуда триплетного сигнала резко уменьшалась. Происходящие в РЦ ФС II процессы образования радикальной пары и триплетных состояний можно суммировать на схеме:



Общая последовательность процессов переноса электрона в РЦ ФС II приведена на рис. XXVII.23. Как видно, за время, меньшее 1 нс, происходит образование радикальной пары $P^+ + \Phi\phi^-$. Наряду с прямым переносом

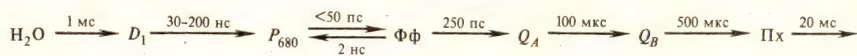
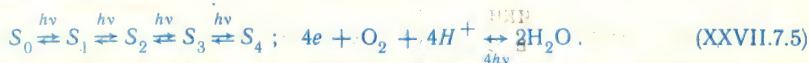


Рис. XXVII.23. Перенос электрона в реакционном центре фотосистемы II

электрона на Q_A и далее на Q_B , возможны и обратные реакции, ведущие к замедленной люминесценции или образованию триплетного состояния. Восполнение дефицита электронов происходит за ~ 30 нс от донора D_1 , берущего электроны за ≤ 1 мс от КВК. Природа донора D_1 неизвестна, хотя имеются данные о его хинонной природе.

Выделение кислорода. Функционирование КВК успешно изучают по кинетике выделения O_2 на одиночные световые вспышки (1—10 мкс). Обнаружено, что освещение одной короткой насыщающей вспышкой света хотя и приводит к восстановлению Q_A в РЦ ФС II, однако не сопровождается выделением O_2 . Выход O_2 на отдельную вспышку зависит от номера вспышки в серии из нескольких последовательных вспышек. Эта зависимость проявляется в виде затухающих колебаний в выделении O_2 на каждую вспышку с периодом в четыре вспышки: максимальный выход наблюдается на 3, 7, 11-ю и т. д.

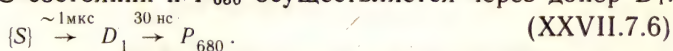
Считают, что окисление двух молекул воды и выделение одной молекулы кислорода требует накопления четырех положительных зарядов в пределах КВК. Это происходит в результате протекания серии из четырех фотоиндуцированных переходов, которые последовательно переводят КВК во все более высокоокисленные состояния



Под действием кванта ФС II захватывает электрон из состояния S_0 , переводит КВК в состояние S_1 , а затем точно так же в состояние S_2 и т. д. Выделение O_2 в (XXVII.7.5) происходит по четырехквантовому механизму. Состояния S_0 и S_1 стабильны в темноте, а S_2 и S_3 в темноте медленно переходят в менее окисленное состояние S_1 за несколько минут с потерей «активации». Система активизируется, когда находится в состоянии S_3 . В этом случае световая вспышка вызывает переход в состояние S_4 ($S_3 \xrightarrow{h\nu} S_4$), где накапливаются четыре положительных эквивалента заряда, благодаря чему в S_4 окисляются две молекулы воды и выделяется O_2 .

Темновая дезактивация более окисленных состояний в менее окисленные может происходить, в основном, по одноступенчатому механизму ($S_3 \rightarrow S_2 \rightarrow S_1$). После длительного освещения постоянным светом устанавливается равномерное распределение по состояниям S_0, S_1, S_2, S_3 (25% в каждом из состояний). В результате последующей темновой адаптации и перехода $S_3 \rightarrow S_1$ и $S_2 \rightarrow S_1$ устанавливается такое распределение: 25% S_0 , 75% S_1 и 0% S_2 и S_3 , а через несколько часов — 20% S_0 и S_1 . Теперь для активации объекта и перевода его в состояние S_2 необходимо дать две вспышки, которые переведут 75% из состояния S_1 в S_3 . Третья по счету вспышка вызовет переход $S_3 \rightarrow S_4$ и интенсивное выделение O_2 , что и наблюдают в опытах. Характерные времена переходов между состояниями $S_0 \rightarrow S_1, S_1 \rightarrow S_2, S_2 \rightarrow S_3$ находятся в пределах 200—500 мкс, что близко к временам переноса $Q_A \rightarrow Q_B$. Однако переход $S_1 \rightarrow S_4$ требует около 2 мс, что указывает на «узкое» место, связанное непосредственно с выделением O_2 .

Сопряжение системы S-состояний и P_{680} осуществляется через донор D_1 :



Необходимым элементом для функционирования КВК является марганец. Удаление Mn^{2+} из препаратов инактивирует донорный участок ФС II и КВК. Утраченная таким образом функциональная активность ФС II восстанавливается путем добавления в среду Mn^{2+} . Предполагают, что два атома Mn^{2+} связаны со специфическим белком (65 000), конформационные превращения которого лежат в основе переходов КВК по $S_0 - S_4$ -состояниям.

§ 8. Механизмы замедленной флуоресценции

Замедленная флуоресценция (ЗФ) дает важную информацию о механизмах переноса электрона в ППФ. Она была открыта Б. Л. Стрелером и В. Арнольдом (1951) при изучении фотофосфорилирования и впоследствии обнаружена

практически у всех фотосинтезирующих организмов. Существует строгая корреляция между ЗФ и функционированием РЦ, выражающаяся в подавлении ЗФ при ингибировании РЦ. У мутантных штаммов, лишенных РЦ, полностью отсутствует и замедленная флуоресценция. ЗФ полностью отсутствует в препарате ССПБК и отчетливо выражена у частиц ФС II (ССПБК + ПБК II) с активными РЦ. Совпадение спектра ЗФ со спектром флуоресценции хлорофилла и бактериохлорофилла доказывает, что ЗФ обусловлена излучательной активацией первого синглетного возбужденного состояния этих пигментов. Спектры возбуждения флуоресценции и ЗФ также совпадают между собой и сходны со спектром действия фотосинтеза. Очевидно, что ЗФ возникает в процессах обратной рекомбинации первичных фотоокисленных и фотовосстановленных продуктов начальных стадий фотосинтеза в РЦ:



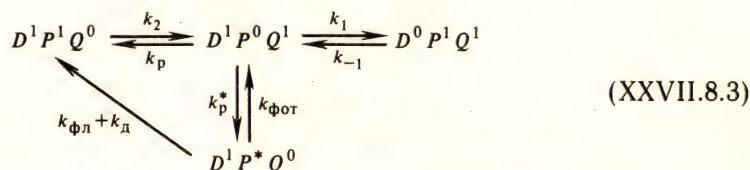
В схеме (XXVII.8.1) восстановление P^+ вторичными донорами (D_1) и окисление $\Phi\Phi^-$ последующими акцепторами должно уменьшать концентрацию P^+ и $\Phi\Phi^-$, а следовательно, ингибировать свечение. В реальных условиях количество компонентов ЗФ и их длительность определяются временами жизни восстановленных и окисленных фотопродуктов, которые сложным образом зависят от кинетики реакций прямого и обратного переноса электрона в ближайшем донорно-акцепторном окружении ФС II. Так, обработка хлоропластов при низких значениях pH (4), замедляющая восстановление P_{680}^+ , одновременно способствует и возникновению более долгоживущих компонентов послесвечения. Аналогично, в пурпурных бактериях ЗФ не возникает в области низких окислительно-восстановительных потенциалов среды, при которых вторичный донор (цитохром *c*) находится в восстановленном состоянии, поскольку в этих условиях происходит быстрое (~ 1 мкс) восстановление P_{890}^+ . Повышение окислительно-восстановительного потенциала среды приводит к окислению цитохрома и возникновению миллисекундного послесвечения в присутствии *o*-фенантролина, который блокирует реакцию переноса $Q_A \rightarrow Q_B$.

Согласно рекомбинационной гипотезе, интенсивность послесвечения (L) пропорциональна количеству РЦ, находящихся в состоянии $[P^+Q_A^-]$. Величина L зависит также от константы скорости излучательной рекомбинации зарядов, ведущей к образованию P^* и вероятности излучательной дезактивации синглетного возбужденного состояния P^* , образованного в результате рекомбинации.

С этих позиций переходы между различными окислительно-восстановительными состояниями комплекса переносчиков в ФС II



представляются в виде следующей схемы:



где D^1 , P^1 , Q^1 — восстановленные, D^0 , P^0 , Q^0 — окисленные компоненты; k_1 , k_{-1} — константы обмена электронами между D и P_{680} ; k_2 — константа скорости, пропорциональная интенсивности действующего света; k_p^* , k_p — константы скоростей излучательной и безызлучательной рекомбинации зарядов

P^* и Q^- ; $k_{\text{фот}}$, $k_{\text{фл}}$ — константы скоростей фотохимической, излучательной и безызлучательной дезактивации состояния P_{680}^* (рис. XXVII.2.4).

В схеме (XXVII.8.3) состояние P_{680}^* возникает только в результате рекомбинации разделенных зарядов, а не за счет прямого возбуждения светом. Интенсивность послесвечения пропорциональна вероятности нахождения центров в состоянии $D^1P^0Q^1$

$$L = N k_p^* \varphi [D^1 P^0 Q^1], \quad (\text{XXVII.8.4})$$

где N — концентрация РЦ, $\varphi = k_{\text{фл}} / (k_{\text{фл}} + k_{\text{фот}} + k_d)$ — квантовый выход излучательной дезактивации состояния P^* , квадратные скобки обозначают вероятность данного состояния.

Переходы в (XXVII.8.3) описываются дифференциальными уравнениями первого порядка для вероятностей нахождения центра в различных состояниях (см. § 2 гл. IV). При низкой интенсивности возбуждающего света все РЦ находятся в открытом состоянии, когда эффективно происходит отток электронов от Q^- . Однако в присутствии диурана даже при низкой интенсивности возбуждающего света центры переходят в закрытое состояние и, поскольку отток электронов от Q^- уже прекращен, интенсивность ЗФ становится пропорциональной общему количеству РЦ.

Другой процесс, влияющий на выход ЗФ, — энергизация фотосинтетической мембраны и образование протонного градиента (см. гл. XXIV). Разница между уровнями возбужденного хлорофилла P^* и первичных восстановленных фотопродуктов составляет около 0,6 эВ, что соответствует энергии активации обратных процессов рекомбинации и объясняет, почему квантовый выход ЗФ очень мал и не превышает $10^{-5} - 10^{-7}$. Однако энергия активации может быть снижена за счет электростатического поля, направленного параллельно образующемуся дипольному моменту $[P^+Q^-]$. Так как рекомбинирующие заряды P^+ и Q^- расположены на противоположных сторонах мембраны, то разница электрических потенциалов Ψ_m сторон мембраны изменяет величину энергетического барьера для послесвечения. В этом случае уравнение (XXVII. 8.4) для скорости рекомбинации, ведущей к ЗФ, имеет вид

$$L = N k_p^* \varphi (D^1 P^0 Q^1) \exp [-(\Delta E - F \Psi_m) / (RT)], \quad (\text{XXVII.8.5})$$

где ΔE — энергия активации в отсутствие поля, F — число Фарадея.

Согласно (XXVII.8.5), с увеличением Ψ_m растет интенсивность ЗФ. Это действительно наблюдается в опытах при создании диффузионной разности электрических потенциалов на мембране путем добавления солей или в присутствии, например, валиномицина, избирательно увеличивающего проницаемость мембраны для K^+ . Замечено, что искусственно созданный трансмембранный градиент протонов (ΔpH) индуцирует всплеск люминесценции. Стимулирующий эффект ΔpH на ЗФ определяется изменением поверхностного электрического потенциала наружной поверхности тилакоида при закислении среды. Аналогично электрической составляющей Ψ_m электрохимического потенциала, значения градиента pH можно включить в уравнение (XXVII.8.5), учитывая, что рекомбинирующие донор и акцептор участвуют в протонном равновесии, изменяя энергию активации процесса рекомбинации:

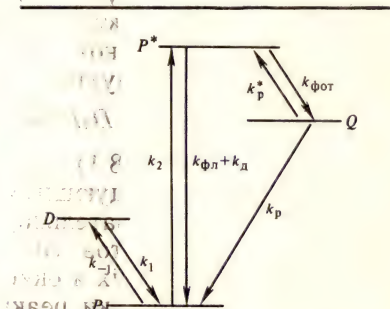


Рис. XXVII.24. Пути переноса электрона между основными компонентами комплекса переносчиков фотосистемы II (объяснение см. в тексте)

$$L = Nk_p^* (D^1 P^0 Q) \exp \{ -\Delta E [F\psi_m - \lg RT (\Delta p H)] / (k_B T) \}. \quad (\text{XXVII.8.6})$$

Выражение в квадратных скобках в (XXVII.8.6) пропорционально протондвижущей силе, поэтому можно после калибровки использовать интенсивность ЗФ для определения значения этой силы, составляющего около 100 мВ.

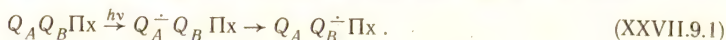
Понижение температуры до $-(30-40)^\circ\text{C}$ ингибирует выделение O_2 и прямые электронтранспортные реакции, в результате чего обратная рекомбинация становится преобладающей. Однако долгоживущие компоненты, указывающие на участие в рекомбинации отдаленных от РЦ восстановленных продуктов, исчезают при охлаждении. При достаточно низких температурах наблюдаются только два компонента свечения: 1—2 и 30 мс, причем первый может соответствовать обратной реакции между P_{680}^+ и Q^- . Повышение температуры активирует ЗФ. Это позволяет оценить энергию активации для различных компонентов свечения (от 0,15 до 0,9 эВ). Образующиеся на свету продукты — предшественники ЗФ — могут быть стабилизированы, если образец охладить до низкой температуры. Последующее нагревание образца в темноте приводит к появлению свечения, которое было названо термолюминесценцией. Очевидно, образованные на свету и стабилизированные при охлаждении образца фотопродукты активируются затем и рекомбинируют с хлорофиллом, приводя к свечению. Кривая зависимости интенсивности термовысвечивания от температуры объекта в процессе нагревания содержит несколько пиков, наблюдаемых при определенных характеристических температурах. Число и положение пиков термолюминесценции отражает различные стадии стабилизации энергии в ФС II и зависит от функционирования кислородвыделяющего комплекса.

§ 9. Хинонный акцепторный комплекс

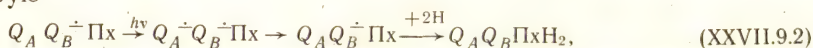
В этом параграфе будут рассмотрены закономерности, которым подчиняется перенос электрона в акцепторном комплексе РЦ, включающем первичный и вторичный хинонные акцепторы Q_A и Q_B . Изучение этого процесса дает важную информацию о физических механизмах переноса электрона в ЭТЦ (см. гл. XXVIII).

Большая часть экспериментальных данных по кинетике переноса электронов в хинонном комплексе была получена с помощью освещения короткими световыми вспышками хлоропластов или изолированных РЦ, хроматофоров и целых клеток пурпурных бактерий.

В хлоропластах в ответ на первую вспышку индуцируется перенос



В ответ на вторую



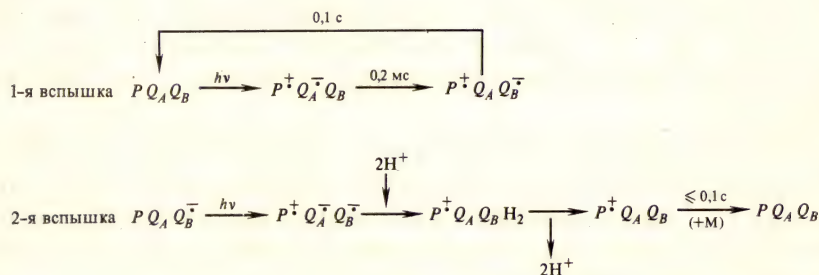
где Пх — пул пластохинонов. Здесь не отображены фотохимические реакции P_{680} , который окисляется на каждую вспышку $P_{680} \rightarrow P_{680}^+$, отдавая электрон на Q_A , и быстро восстанавливается от D_1 . Известно, что семихиноны ($Q^{\dot{-}}$) характеризуются поглощением в спектральной области 320—450 нм (появление такого поглощения ясно указывает на образование семихинона). Поэтому если осветить РЦ одиночной вспышкой света, то возникает поглощение при 320—450 нм, которое не изменяется при переходе

$Q_A^{\dot{-}} Q_B \xrightarrow{200-500\text{мкс}} Q_A Q_B^{\dot{-}}$, так как число семихинонов при этом остается тем же.

Состояние может сохраняться в темноте в течение нескольких секунд. Однако после второй вспышки света происходит уже образование дважды восстановленного хинона Q_B^{2-} и исчезновение полосы поглощения семихинона. Молекула Q_B^{2-} протонируется из внешнего окружения и обменивается с одной молекулой хинона из пула Пх, занимая ее место. Система возвращается в исходное состояние с той лишь разницей, что одна молекула пула теперь протонирована $ПхН_2$. Третья вспышка опять приводит к образованию семихинонных радикалов и соответствующему увеличению поглощения. Колебания оптического поглощения в области 320—450 нм соответствуют образованию и распаду семихинонного радикала, что сопровождается аналогичными колебаниями сигнала ЭПР ($g=1,82$).

В препаратах хроматофоров и РЦ пурпурных бактерий перенос электронов в пул убихинонов происходит аналогичным образом и также приводит к появлению осцилляций (рис. XXVII.25). Двухтактные колебания наблюдаются, как правило, в хроматофорах, к которым добавляется медиатор (М), быстро восстанавливающий фотоокислительный пигмент перед очередной вспышкой света.

Общая схема процесса имеет вид



Образованный дважды восстановленный вторичный хинон $Q_B H_2$ быстро окисляется при достаточно высоких окислительно-восстановительных потенциалах среды. Наоборот, семихинонный вторичный акцептор Q_B^- более стабилен и медленно окисляется за счет реакции с окисленной формой медиатора. Поэтому время между вспышками должно быть достаточным для того, чтобы медиатор (М) успел полностью восстановить пигмент перед очередной вспышкой ($\geq 0,1$ с). Вместе с тем оно не должно превышать время жизни семихинонной формы вторичного хинона Q_B^- в рассматриваемых условиях, поскольку в противном случае Q_B^- будет окислен медиатором в темновом процессе. Стабильность связи семихинонной формы Q_B^- с белком РЦ по сравнению с $Q_B H_2$ может быть обусловлена сильным электростатическим взаимодействием положительно заряженной имидазольной группы гистидинового остатка или Fe^{2+} белка с отрицательно заряженным Q_B^- . Ингибитор переноса электрона *о*-фенантролин обратимо вытесняет Q_B с места специфического связывания на белке, однако не оказывает ингибирующего действия на перенос электрона от Q_A к семихинонной форме Q_B^- , прочно связанной с белком РЦ.

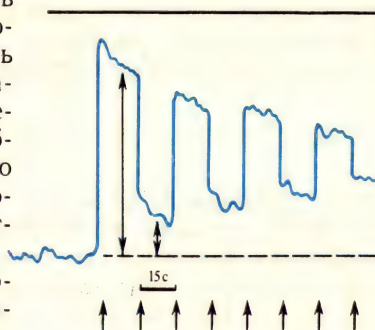
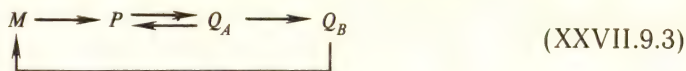
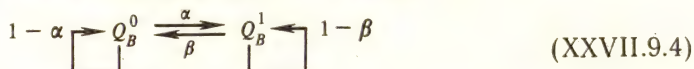


Рис. XXVII.25. Изменение поглощения (ΔA) семихинонной формы вторичного хинонного акцептора под действием последовательных вспышек света

Упрощенная схема взаимодействия в акцепторной части РЦ пурпурных бактерий с медиатором имеет вид



Математическое описание двухтактных колебаний основано на рассмотрении простейшей схемы переходов хинонов под действием вспышек света, где учитываются только превращения вторичного хинона:



Если до очередной вспышки хинон находился в окисленном состоянии Q_B^0 , то после вспышки он перейдет с вероятностью α в полувосстановленную семихинонную форму Q_B^1 , а с вероятностью $(1-\alpha)$ может остаться в исходном состоянии. Аналогично, если до вспышки хинон уже находился в состоянии Q_B^1 , то после нее он может дважды восстановиться и быстро перейти в полностью окисленное состояние за счет реакции с медиатором (с вероятностью β) или остаться в том же состоянии (с вероятностью $1-\beta$). Схема (XXVII.9.4) описывает изменения состояния Q_B только в момент вспышки света. При малой длительности насыщающей вспышки света величины α и β можно отождествить с квантовыми выходами переноса электрона от P^+ на Q_B^0 и Q_B^1 соответственно.

Модель дает выражения для вероятностей образования семихинонной формы Q_B^{\pm} и позволяет связать характер наблюдаемых колебаний поглощения при 450 нм с величинами α и β . Оказалось, что для большинства объектов средняя величина суммы квантовых выходов на две вспышки составляет $\alpha + \beta \simeq 1,84$. Это хорошо согласуется с величиной 0,96—0,98 для квантового выхода начального этапа переноса электрона — разделения зарядов в РЦ.

В нормальных условиях в клетках роль пула вторичных хинонов состоит в обеспечении циклического транспорта электронов (см. рис. XXVII. 6), который проходит через высокопотенциальный цитохром и включает цитохромный комплекс ($b-c_1$), обладающий убухинол-цитохром c_1 -оксидоредуктазной активностью. Окислительно-восстановительное титрование препаратов цитохромного комплекса показывает наличие в нем двух цитохромов b с близкими спектральными свойствами и высокопотенциального цитохрома c_1 . Дважды восстановленный вторичный хинон $Q_B M_2$ обменивается с пулом хинонов на молекулы Q_B . Тем самым создается возможность восстановления через пул цитохромного комплекса ($b-c_1$). В этот комплекс, помимо двух цитохромов b и цитохрома c_1 , входит железосерный белок Риске (FeS_R) и хинонный компонент Q_z . Перенос электрона в комплексе происходит от цитохрома b через хинонный компонент Q_z на FeS_R и далее на цитохром c_1 , входящий в комплекс. Последний непосредственно отдает электрон подвижному высокопотенциальному цитохрому c_2 , который за несколько миллисекунд восстанавливает P_{870}^+ .

Электронно-конформационные взаимодействия в первичных процессах фотосинтеза



Реакционные центры фотосинтеза представляют собой сложно организованные многокомпонентные макромолекулярные комплексы переносчиков. Главные особенности транспорта электронов в РЦ — его высокая эффективность и направленный характер. Очевидно, обычные диффузионные механизмы химических реакций в растворах по типу сталкивающихся частиц не в состоянии обеспечить такого рода перенос электрона в РЦ на всех участках цепи. Расстояния между соседними переносчиками (0,3—0,7 нм) и энергетические зазоры между их уровнями таковы, что возможно перекрывание их орбиталей, благодаря чему создаются условия для делокализации электрона. Однако высокая эффективность переноса обеспечивается лишь в том случае, если электрон не имеет возможности возвращаться назад по перекрывающимся орбиталям к исходному переносчику. Только тогда электрон переносится дальше по цепи, удаляясь от первичного донора до того, как он успеет рекомбинировать (см. § 5 гл. XXVII). Это возможно только при условии диссипации части электронной энергии при прямом переносе, что затрудняет обратный перенос электрона. Эффективным механизмом, обеспечивающим такого рода электронный транспорт, является туннелирование электрона, при котором часть электронной энергии воспринимается акцептирующей модой (см. § 3—6 гл. XIII) и рассеивается по колебательным степеням свободы.

Ниже будут рассмотрены данные, показывающие, в каких случаях и каким образом перенос электрона сопряжен с внутримолекулярной конформационной динамикой белка РЦ.

§ 1. Температурная зависимость переноса электрона в реакционных центрах

Механизмы электронных переходов выявляются в опытах с измерением температурной зависимости переноса электрона и параллельным изучением характера внутримолекулярной динамики белка РЦ (рис. XXVIII.1).

Температурная зависимость. В § 5—6 гл. XIII была рассмотрена природа двухфазной температурной зависимости туннелирования электрона, наблюдающейся в случае сильной электронно-колебательной связи в донорно-акцепторном комплексе (при высоких температурах преобладают переходы с высоких колебательных подуровней, заселение которых требует тепловой энергии). При низких температурах туннелирование электрона возможно, если оно сопряжено с туннелированием ядер, находящихся на нижних колебательных подуровнях, и достижением при этом ядрами координат, при которых энергии начального и конечного состояний комплекса совпадают. В случае низких температур, когда $k_B T \ll \hbar \omega$, согласно (XIII.6.5), константа скорости (k_{if})

$$k_{if} \sim (S_q/q) e^{-S}.$$

(XXVIII.1.1)

Здесь S (константа электронно-колебательной связи) отражает величину относительной деформации молекулы вдоль координаты акцептирующей моды ω при изменении электронного состояния [см. (XIII.5.14)]; q — целое число, ближайшее к величине $\Delta E_0/(\hbar\omega)$.

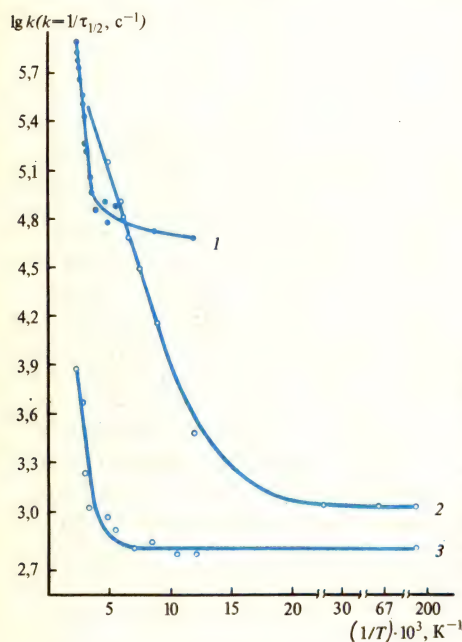


Рис. XXVIII.1. Температурная зависимость константы скорости (k) переноса электрона в реакциях $C_L \rightarrow P_{670}^+$ (1), $A_1^- \rightarrow P_{700}^+$ (2) и $Q_A^- \rightarrow P_{680}^+$ (3)

Приведена кривая температурной зависимости скорости окисления низкпотенциального цитохрома (C_L) в хроматофорах пурпурных бактерий. Подобный характер двухфазной температурной зависимости наблюдается и для реакции рекомбинации P_{680}^+ и первичного пластохинона Q_A^- в ФС II, а также P_{700}^+ и A_1^- в ФС I высших растений

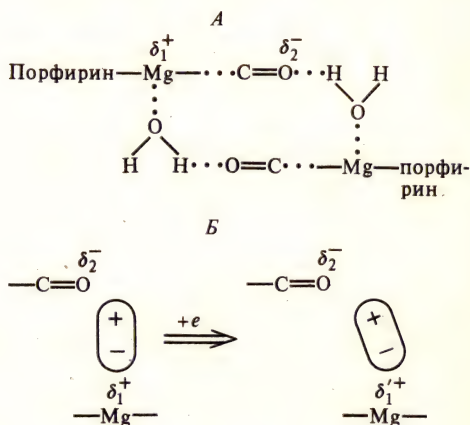
Изотопный эффект. Замена H_2O на D_2O в бактериальных хроматофорах приводит при низких температурах к уменьшению константы скорости окисления C_L реакционным центром в $\sim 1,4$ раза, причем этот эффект несколько уменьшается при переходе к комнатным температурам. Частота колебаний акцептирующей моды, найденная по температуре точки излома кривой температурной зависимости рассматриваемой реакции составляет $330-350 \text{ см}^{-1}$. Это очень близко к частоте колебаний H_2O в гидратных оболочках Mg и Fe. Замена H_2O на D_2O уменьшает ω до 314 см^{-1} и несколько увеличивает S_{H_2O} от 6,6 до $S_{D_2O} \approx 7$. Характерные изменения равновесных расстояний между Mg^{2+} и H_2O в координационной сфере при изменении заряда иона на единицу составляют $\Delta R \sim 0,01 \div 0,12 \text{ нм}$. Сопоставляя это со значением параметра связи $S_{H_2O} = 6,6$, можно заключить, что в процессе участвуют две-три молекулы воды (рис. XXVIII.2).

Природа акцептирующей моды в данном случае связана, таким образом, с переориентацией диполей воды. Однако эту роль могут выполнять и другие высокочастотные колебания легких атомных групп. В частности, возможны смещения равновесного положения H_2 вдоль направления несимметричной двухъямной водородной связи с диссипацией в теплоту части энергии (см. § 2 гл. VIII; рис. VIII.4).

Независимость от температуры. В РЦ существуют другие процессы низкотемпературного переноса, которые также носят туннельный характер, но прак-

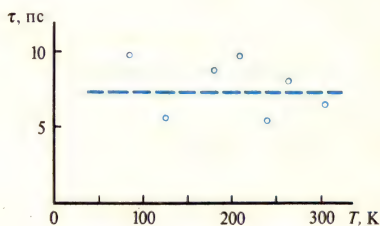
тически не зависят от температуры во всем исследованном температурном диапазоне и не обладают двухфазной температурной зависимостью. Так, из рис. XXVIII.3 видно, что процесс разделения зарядов на участке $P_{870} \rightarrow$ Бфф и образование окисленного P_{870}^+ является температурно независимым процессом. Речь идет в данном случае о слабой электронно-колебательной связи, где перенос носит безактивационный характер (см. рис. XIII.8). Возможно,

Рис. XXVIII.2. Участие молекул воды в диссипации энергии по акцептирующей моде в реакции окисления цитохрома в РЦ пурпурных бактерий



При изменении зарядового состояния димера (А) изменяются эффективные заряды δ_1 и δ_2 на атомах Mg и кислорода C=O-группы. Это должно вызвать изменение равновесного положения диполя воды (Б)

Рис. XXVIII.3. Температурная независимость первичного разделения зарядов в паре P_{870} —Бфф, измеренная по затуханию флуоресценции P_{870}^+ в РЦ пурпурных бактерий



роль акцептирующей моды выполняют здесь высокочастотные колебания атомов водорода. Расчеты показывают, что приход электрона в молекулу Бфф изменит ее конформационное состояние, вызывая переход H_2 в центральной полости молекулы от N_2 природных циклов к N_2 пирроленовых циклов. Этот внутримолекулярный микроконформационный переход сопровождается диссипацией $\leq 0,2$ эВ, что способствует стабилизации электрона на Бфф. После ухода электрона от Бфф на Q_A молекула возвращается в исходную конфигурацию, а атомы Н занимают прежнее место.

Другой важный случай температурно независимого процесса представляет собой окисление высокопотенциального цитохрома C_H ($E_{1/2} \sim +300$ мВ) в хроматофорах некоторых пурпурных бактерий (рис. XXVIII.4).

Роль контактных состояний. Очевидно, характер наблюдаемых температурных зависимостей переноса электрона определяется двумя факторами (см. § 6, 8 гл. XIII). Во-первых, это собственно внутримолекулярные электронно-колебательные взаимодействия, отражающие роль квантовой акцептирующей моды. Во-вторых, здесь играют роль мягкие моды, отражающие конформационные перестройки белков-переносчиков, при которых обеспечивается

движение донорно-акцепторных групп в процессе формирования контактных состояний между ними. Именно спонтанное движение донорно-акцепторных групп в комплексе $C_H - P_{870}$ определяет возможность формирования такого контактного состояния, в пределах которого происходит туннелирование электрона, характеризующееся слабой электронно-колебательной связью.

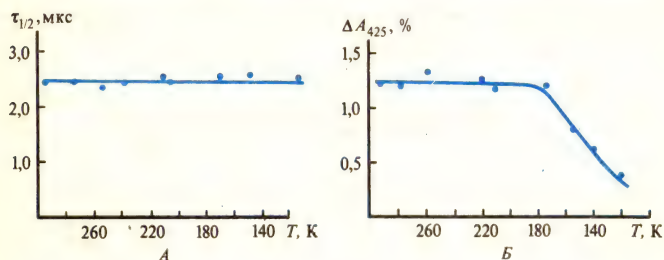


Рис. XXVIII.4. Зависимость от температуры времени ($\tau_{1/2}$) и амплитуды сигнала (ΔA_{425}) процесса окисления высокопотенциального цитохрома C_H

В отличие от низкопотенциального цитохрома C_L скорость окисления C_H практически не зависит от температуры, по крайней мере в диапазоне от 300 до 120 К (А). Однако при температурах ниже некоторой критической наблюдается уменьшение количества молекул цитохрома C_H , способных подвергаться фотоиндуцированному окислению (Б). У оставшихся активными молекул C_H конечные скорости окисления остаются практически неизменными. Дегидратация образцов оказывает на реакцию окисления C_H аналогичное действие

Каждый из активных гемов цитохрома C_H в комплексе $C_H - P_{870}$ может находиться по крайней мере в двух выделенных состояниях, контактном и неконтактном, переходы между которыми происходят спонтанно. До момента светового воздействия в комплексе $C_H - P_{870}$ устанавливается статистическое равновесие между числом гемов в обоих состояниях. Вероятность заселенности этих состояний определяется разностью их свободных энергий $\Delta F = \Delta U - T\Delta S$) и выражается как

$$\bar{N} = \exp[-\Delta F/(RT)] / 1 + \exp[-\Delta F/(RT)]; \quad N = 1 / 1 + \exp[-\Delta F/(RT)] \quad (\text{XXVIII.1.2})$$

для контактного (\bar{N}) и неконтактного (N) состояний соответственно. Хотя функционально-активная контактная конформация энергетически выше, чем неконтактная ($\Delta U = \bar{U} - U > 0$), но она обладает значительно более высокой энтропией ($\Delta S = \bar{S} - S > 0$; $|T\Delta S| > \Delta U$), так что в целом $\Delta F = \bar{F} - F < 0$ ($\Delta F = \Delta U - T\Delta S$).

Для реализации контактного состояния необходима определенная конформационная свобода или набор степеней свободы молекулы цитохрома. Таким образом, речь идет о структурном туннелировании между донорно-акцепторными группами (см. § 7 гл. XIII), где белковая цепь, видимо, выступает как медиатор электронного переноса. В такой системе удаление молекул воды при высушивании и понижение температуры сказывается на возможности образования электронной «тропы» в макромолекулярном комплексе, где донорно-акцепторные группы занимают соответствующие места. В контактной позиции существует перекрытие волновых функций групп D и A , и поэтому расстояние между ними составляет около 0,1 нм. В неконтактной позиции расстояние между группами D и A увеличивается до 0,3—0,5 нм (такова амплитуда сегментального движения отдельных α -спиральных участков белка, возможных носителей групп D и A). Поскольку

на расстояниях 0,3—0,5 нм перекрытие волновых функций практически равно нулю, между группами возникает барьер $\Delta E \leq 10$ эВ, соответствующий потенциалу ионизации нейтральных групп. Это сразу же снижает скорость туннелирования в неконтактной позиции в 10^6 раз, т. е. делает практически невозможным перенос электрона.

Сопоставление кинетических параметров реакции окисления S_H с данными о динамике фотосинтетических мембран при дегидратации последних (подробнее см. § 2 данной главы) позволило получить дополнительную информацию о механизме процесса образования и разрушения контактных состояний. Уменьшение эффективности переноса электронов от S_H на P_{890} при дегидратации происходит в том же диапазоне относительной влажности, где наблюдается десорбция слабосвязанной подвижной воды, время спин-спиновой релаксации протонов которой составляет несколько миллисекунд (см. § 4 гл. IX). Взаимодействие цитохрома *c*, представляющего собой периферический мембранно-связанный белок, с мембраной обусловлено соотношением сил электростатического взаимодействия с полярными головками липидов и гидрофобных сил, которые определяют частичное внедрение белка в неполярную область. Так, при взаимодействии цитохрома *c* с искусственными бислоями, в которых преобладают «кислые» липиды, гидрофобные силы вносят существенный вклад, причем цитохром, внедряясь в глубь мембраны, как бы частично «разжижает» бислой.

Отверждение слоя, происходящее при понижении температуры или уменьшении степени гидратации, должно, очевидно, приводить к «вытеснению» цитохрома из гидрофобного слоя подобно другим периферическим белкам. Именно такие эффекты и наблюдаются для митохондриального цитохрома *c* при его взаимодействии с бислоем. Для высокопотенциальных мембранно-связанных цитохромов S_H механизм перехода в неконтактное состояние, по-видимому, носит аналогичный характер.

Уже неглубокая дегидратация фотосинтетических мембран приводит к существенному увеличению их вязкости, что видно по изменению подвижности гидрофобных зондов (см. § 2 этой главы). Именно это и может приводить к размыканию контакта между интегральным белком РЦ и цитохромом S_H по указанному механизму.

В то же время стабилизация контакта в комплексе РЦ с цитохромом S_H может быть обусловлена взаимодействием групп самих белков, если в результате размыкания контакта неполярные боковые остатки аминокислот становятся доступными для воды. При этом в соответствии с общепринятым механизмом гидрофобного связывания (см. § 4 гл. IX) должно происходить структурирование окружающей воды и, следовательно, понижение энтропии системы, которое частично компенсируется уменьшением энтальпии при образовании дополнительных водородных связей в воде. Такие перестройки могут, очевидно, наблюдаться только при достаточно высокой степени гидратации в присутствии слабосвязанной воды.

На рис. XXVIII.5 приведена в качестве примера схема, иллюстрирующая возможность образования контактного и неконтактного состояний по этому механизму. Баланс сил, обуславливающий стабилизацию контактного состояния, определяется полярным взаимодействием контактирующих групп 1 и 2 и гидрофобными силами, которые зависят от наличия молекул воды в системе. В присутствии воды при низких температурах неконтактная позиция (В) сохраняется вследствие слабой подвижности структурных групп и молекул воды в области контакта. Однако при повышении температуры подвижность отдельных молекулярных групп и, главное, молекул воды растет. Следовательно, возрастает и энтропия системы. Именно это обстоятельство делает

энергетически более выгодной и устойчивой при комнатной температуре позицию А, несмотря на то что энтальпия в этом состоянии увеличивается. В пределах позиции А происходит формирование собственно контактного состояния между подвижными группами 1 и 2. Снижение энтропии, сопровождающее образование комплекса, не может существенно уменьшить общую

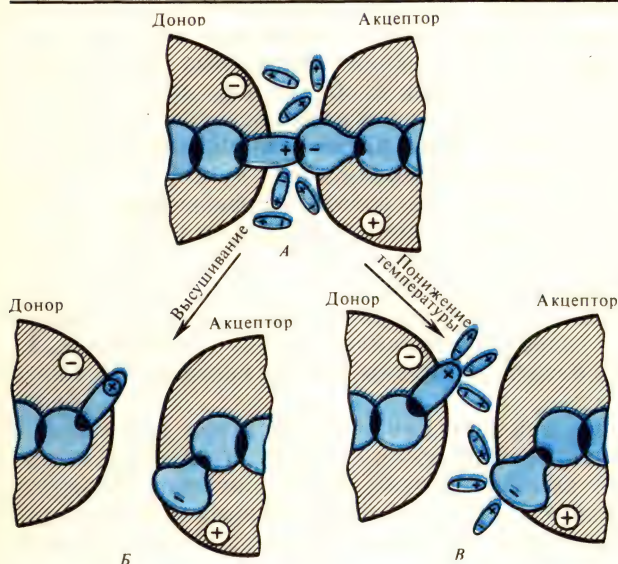


Рис. XXVIII.5. Поведение молекулярных групп в области контакта между макромолекулами высокопотенциального цитохрома (донор) и реакционного центра (акцептор) в фотосинтетических мембранах пурпурных бактерий при понижении степени гидратации и температуры. А—контактная позиция; Б, В—неконтактные позиции

величину энтропии конформационно «расторможенной» позиции А. Таким образом, роль воды здесь заключается в одновременном обеспечении конформационной подвижности и «энтропийной» устойчивости контактного состояния. Аналогичную роль может играть вода и в акте первичного разделения зарядов. Как оказалось, удаление воды ингибирует процесс разделения зарядов в РЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий, нарушая образование контактных состояний, либо препятствует стабилизации электрона на Бфф за счет изменения характера водородных связей.

Таким образом, действие температуры и влажности в случае слабой электронно-колебательной связи осуществляется через мягкие моды путем влияния на формирование контактного состояния между функционально активными группами. Однако и при сильной электронно-колебательной связи активационный характер туннелирования не исключает вклада в наблюдаемую температурную зависимость процессов формирования контактных состояний.

§ 2. Конформационная динамика и перенос электрона в реакционных центрах

Электронные переходы должны быть сопряжены с внутримолекулярной подвижностью белка РЦ, которая обеспечивает, во-первых, процессы электронно-колебательной релаксации по акцептирующей моде и фиксации электрона в акте туннельного переноса и, во-вторых, индуцированные вследствие изменения зарядового состояния акцептора последующие конформационные перестройки в макромолекулярном комплексе. Для изучения этой проблемы на кафедре биофизики биологического факультета МГУ (А. Б. Рубин, А. А. Коно-

ненко, К. В. Шайтан) совместно с институтом химической физики АН СССР (В. И. Гольдманский, Г. И. Лихтенштейн, Ю. Ф. Крупянский, Е. Н. Фролов) было проведено исследование внутримолекулярной подвижности белка РЦ и эффективности переноса электрона при соответствующих параметрах температуры и влажности препаратов. В этих опытах показатели электронно-транспортной активности РЦ сопоставляли с параметрами введенных в препараты спиновых зондов и меток (нитроксильные радикалы), гамма-резонансных зондов (^{57}Fe), люминесцентных меток (индикаторы локальных внутримолекулярных движений с частотами 10^7 – 10^9 с $^{-1}$), а также фосфоресцентных меток (регистрируемые частоты движения 10^3 – 10^1 с $^{-1}$).

Влияние температуры и гидратации. На рис. XXVIII.6 показаны температурные зависимости эффективности фотоиндуцированного прямого переноса электрона (N) в системе хинонных акцепторов, а также времен корреляции вращательной диффузии спиновой метки, ковалентно присоединенной к SH-группам белка и гидрофобного спинового зонда в мембранах хроматофоров (см. § 2, гл. X). В интервале 140–180 К величина τ' (эффективный параметр времени корреляции) изменяется мало, что указывает на отсутствие быстрых движений в системе. Однако при повышении температуры происходит резкое уменьшение τ' до значений $\leq 10^{-7}$ с, что свидетельствует о «размораживании» движений в белково-липидном локальном окружении нитроксильных фрагментов. В том же температурном диапазоне, где возрастает внутримолекулярная подвижность белка РЦ, увеличивается и функциональная активность. При $T < 180$ К сильному торможению подвижности соответствует и низкий (близкий к нулевому) уровень электронно-транспортной активности.

На рис. XXVIII. 6, Б видно, что согласованность в изменении

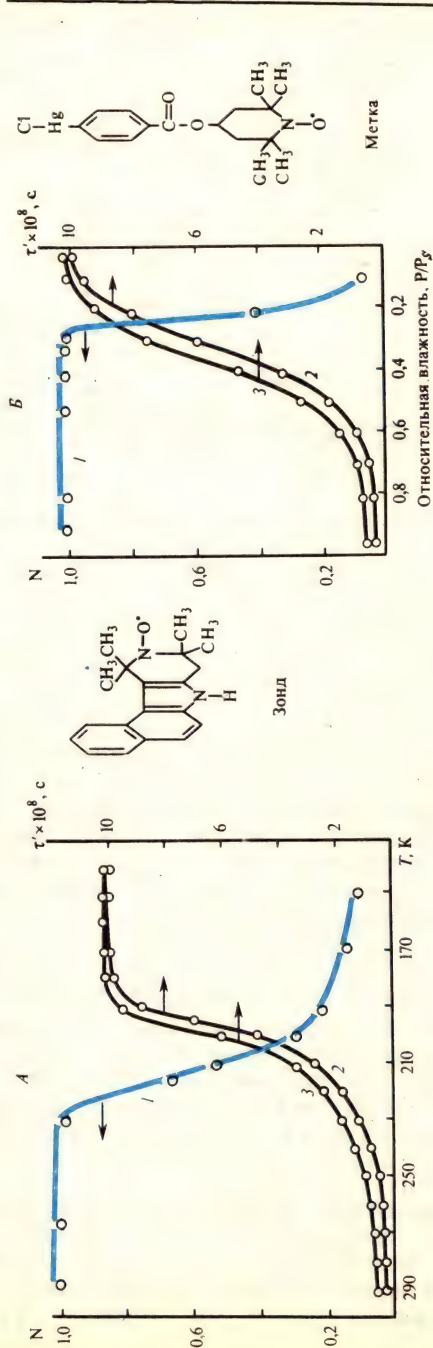


Рис. XXVIII.6. Функциональная активность (1) и конформационная динамика (2, 3) реакционных центров в спин-меченых хроматофорах *R. rubrum* в зависимости от температуры (А) и влажности (Б): N — эффективность фотоиндуцированного переноса электрона от Q_A на Q_B (кривые 1); τ' — эффективный параметр времени корреляции вращательной диффузии гидрофобного спинового зонда (2) и спиновой метки на SH-группы (3)

эффективности переноса электрона от Q_A на Q_B и динамических параметров фотосинтетической мембраны отчетливо проявляется и при изменении степени гидратации препаратов.

При использовании методики ЭПР с насыщением сигнала удалось показать, что нитрокислородный радикал участвует также в более медленных движениях с частотами $\nu_c = 10^3 \text{ с}^{-1}$, возможно, связанных с липидной фазой РЦ.

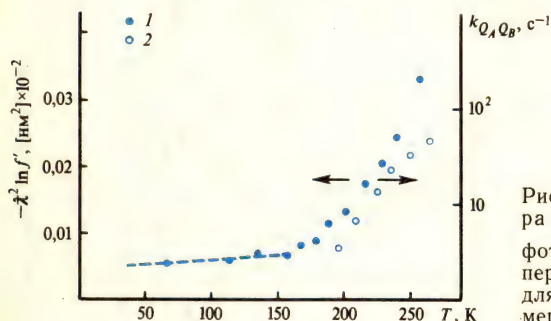


Рис. XXVIII.7. Температурная зависимость фактора f' (1) и константы скорости ($k_{Q_A Q_B}$) (2) фотоиндуцированного переноса электрона от первичного хинонного акцептора ко вторичному для хроматофоров (величина фактора f' является мерой вероятности эффекта Мёссбауэра)

Типичная температурная зависимость вероятности поглощения γ -кванта без отдачи или фактора $f'(-\ln f')$ [см. (X. 2.26)] для хроматофоров показана на рис. XXVIII.7. Видно, что при повышении температуры $T > 170 \text{ K}$ величина f' падает; это свидетельствует о появлении движений мёссбауэровского атома ^{57}Fe с амплитудами $\langle x_a \rangle \gg 0,03 \text{ нм}$ и временами, превышающими 10^{-7} с . Следовательно, при $T > 170 \text{ K}$ растормаживается движение белковой макромолекулы по конформационным подсистемам.

Однако в обезвоженных препаратах, когда содержание воды не превышает 3%, кривая $f'(T)$ монотонна и не имеет точки перегиба. Амплитуда смещений мёссбауэровских ядер лишь несколько увеличивается при нагревании, но зависимость от температуры остается линейной, т. е. типичной для кристаллических твердых тел (см. гл. X). В увлажненных образцах зависимость $f'(T)$ в области температур ниже 180–200 K совпадает с аналогичной зависимостью для максимально высушенных препаратов; при дальнейшем нагревании наблюдается аномальное уменьшение f' и соответствующее возрастание амплитуды смещений. Оказалось, что границы излома для гидрофобных мёссбауэровских меток лежат в целом при более низких температурах, чем для меток, локализованных в полярных областях. Эти данные свидетельствуют о более высокой подвижности внутренних областей мембран по сравнению с поверхностными участками, по крайней мере при низких температурах. Очевидно, в процессе нагревания образца начинает растормаживаться подвижность внутренних гидрофобных областей. В дальнейшем активируются и движения поверхностных гидрофильных участков мембраны, а также собственно молекулярные движения мембранных белков.

Определение параметров подвижности. В соответствии с моделью ограниченной диффузии (см. § 1 гл. XI), основным фактором, вызывающим увеличение подвижности мёссбауэровского атома при росте температуры, является уменьшение времени корреляции движения τ_c вследствие уменьшения коэффициента трения (γ). Согласно (XI.1.27) — (XI.1.29),

$$\tau_c = \gamma / (m \omega_0^2) = 6\pi b \eta / (m \omega_0^2), \quad (\text{XXVIII.2.1})$$

где $\eta = \eta_0 e^{\varepsilon/RT}$ — микровязкость в локальной окрестности мёссбауэровского ядра, ω_0 — частота колебаний в отсутствие активации вязкого течения внутри белковой глобулы;

$$\tau_c \sim \eta \sim e^{\varepsilon/(RT)}. \quad (\text{XXVIII.2.2})$$

Путем обработки экспериментальных кривых $f'(T)$ были найдены значения энергии активации вязкого течения, микровязкости при комнатной температуре и их зависимости от степени гидратации хроматофоров. Значение $\varepsilon \simeq 8$ кДж/моль для гидрофобных областей мембраны близко к энергии активации заторможенного вращения вокруг С—С-связи. Это означает, что флуктуации плотности в гидрофобной среде, делающие возможным смещение метки, определяются конформационными движениями липидной цепи. Значение $\varepsilon \sim 25$ кДж/моль для поверхностных участков мембраны близко к энергии водородных связей и энергии активации вязкости воды. Абсолютные значения микровязкости в случае размеров движущегося участка в $\simeq 0,5$ нм составляют примерно 60 и 40 Па·с для гидрофобных и полярных областей и возрастают в несколько раз при обезвоживании препаратов. Большие абсолютные значения микровязкости ($\eta \sim 10$ Па·с) по сравнению с обычно измеряемыми величинами вязкости липидов (0,1—1,0 Па·с) свидетельствуют о специфическом микроокружении в окрестности введенной метки (см. § 4, гл. XV).

Корреляция эффективности транспорта электрона и величины $f'(T)$ не означает непосредственной связи переноса электрона именно с теми конформационными степенями свободы, которые дают вклад в движение мёссбауэровского атома. Резкое уменьшение фактора f' указывает лишь на то, что в рассматриваемой области температур происходит быстрое уменьшение времен корреляции конформационных движений с амплитудой $\geq 0,1$ нм ниже значений 10^{-7} с. Тем самым создаются предпосылки для растормаживания других, более масштабных конформационных степеней свободы. Это, в свою очередь, создает условия для формирования контактных донорно-акцепторных состояний, в пределах которых происходит туннелирование электрона в системе хинонных акцепторов.

Согласно другой модели дискретных состояний и фазовых переходов (см. § 2 гл. XI), вероятность эффекта Мёссбауэра определяется заселенностью закрытого неконтактного состояния, где слабые связи насыщены ($f' = 1$). Уменьшение f' означает переход в открытое контактное состояние. Вероятность заселенности закрытого состояния N или вероятность f' эффекта Мёссбауэра определяется выражением (XI.2.4)

$$N = f' = [1 + \exp\{-\Delta F/(RT)\}]^{-1}, \quad (\text{XXVIII.2.3})$$

где $\Delta F = \Delta U = T \Delta S$ ($\Delta U \simeq \Delta H$, так как $\Delta U \simeq 0$) — разность свободных энергий двух состояний [см. (XXVIII.1.2)]. Так же как и в случае окисления цитохрома C_{H^+} изменения ΔS при переходе от закрытого (неконтактное) к открытому (контактное) состоянию в системе хинонных акцепторов характеризуются большими положительными значениями ($\Delta S = 5 \div 15$ э.е.), что может свидетельствовать о кооперативном характере этого перехода.

Метод γ -резонансной спектроскопии позволяет регистрировать высокочастотные движения ($\tau < 10^{-7}$ с) с амплитудами $\geq 0,02$ нм в фотосинтетических мембранах и РЦ. Измерение параметров флуоресценции и фосфоресценции хромофорных меток [см. § 2 гл. X] в тех же температурных областях позволило оценить подвижность молекул среды в диапазоне времен τ_c от 1 до 10^{-9} с. Оказалось, что, как и в случае применения методов ЯГР и ЭПР, температурная зависимость для эффективности прямого переноса электрона от Q_A на Q_B лучше коррелирует с быстрыми движениями в поверхностных слоях препаратов с

характерными временами $\tau_c \sim 10^{-8}$ с. Изменения скорости рекомбинации P^+ и Q_A^- в реакции $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$ хорошо коррелируют с появлением в образцах при размораживании низкочастотных движений с $\tau_c \gg 10^{-8}$ с. В температурном интервале 185—200 К в поверхностных слоях мембраны и мембранных белков проявляются движения с $\tau_c \sim 10^{-3}$ с, регистрируемые по сдвигам спектров фосфоресцентных меток (эозинизотиоцианат). Одновременно в интервале 180—190 К во внутренних частях мембранных белков также наблюдаются движения с временами $\tau_c \sim 1$ с, которые регистрируются по сдвигу спектров собственной фосфоресценции ароматических аминокислот.

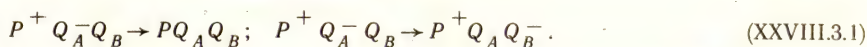
Таким образом, наблюдаемая конформационная подвижность характеризуется широким набором времен релаксации (от 1 до 10^{-8} с в зависимости от температуры). Это и составляет основу для формирования контактных состояний между компонентами цепи.

Проявление при данной температуре того или иного вида движения с определенным значением времени корреляции τ_c не означает, что смещение соответствующих молекулярных групп полностью отсутствовали при других температурах. Наблюдаемые температурные эффекты могут быть связаны с такими изменениями уже существующих движений молекулярных групп, когда их времена корреляции попадают в пределы временного разрешения данного метода и становятся тем самым доступными для наблюдения.

§ 3. Перенос электронов и формирование контактных состояний в системе хинонных акцепторов (PQ_AQ_B)

Система хинонных акцепторов представляет собой характерный пример, где влияние температуры на перенос электрона может осуществляться не только путем изменения константы скорости (см. § 5—7 гл. XIII), но и через образование контактных состояний между переносчиками в комплексе PQ_AQ_B .

Рекомбинационные процессы в PQ_AQ_B . В § 9 гл. XXVII было показано, что под действием света фотоактивный пигмент окисляется, а электрон сначала переходит на Q_A , а затем на Q_B . Поэтому на свету вначале образуется состояние $P^+Q_A^-Q_B$, которое распадается по двум каналам:



После выключения света наблюдается темновое восстановление фотоокисленного пигмента P , которое носит обычно двухкомпонентный характер (рис. XXVIII.8). Быстрый компонент восстановления соответствует возвращению электронов на P^+ от Q_A^- из состояния $P^+Q_A^-Q_B$ ($P^+Q_A^-Q_B \rightarrow PQ_AQ_B$), а медленный — от Q_B^- из состояния $P^+Q_AQ_B^-$ ($P^+Q_AQ_B^- \rightarrow PQ_AQ_B$).

Таким образом, эффективность (N) переноса электрона от Q_A к Q_B можно оценить по соотношению медленного и быстрого компонентов темнового восстановления P^+ . Уменьшение величины N при понижении температуры и влажности свидетельствует о падении эффективности переноса электрона между Q_A и Q_B (см. рис. XXVIII.5 и XXVIII.6). Однако причина может состоять не только в уменьшении константы скорости переноса $Q_A \rightarrow Q_B$. Оказалось, что при некоторых достаточно низких температурах ($T < 200$ К) вклад медленного компонента темнового восстановления значительно уменьшается, что свидетельствует о блокировании переноса электрона между Q_A и Q_B (рис. XXVIII.8, 1). Если же охлаждение препаратов производят при одновременном освещении, то кинетика восстановления P^+ при низких температурах, по существу, не отличается от таковой при комнатной температуре. Она характеризуется лишь медленными компонентами восстановления P^+ . При охлажде-

нии препаратов на свету часть пигментов P^+ вообще теряет способность к темновому восстановлению и реакция фотоокисления P становится в этих центрах практически необратимой (рис. XXVIII.8, III).

Контактные состояния в $PQ_A Q_B^-$. В образцах РЦ, предварительно охлажденных в темноте, эффективность переноса на Q_B резко уменьшается при понижении температуры до 190 К. В тех же образцах, охлажденных на свету, в некоторых РЦ эффективность переноса $Q_A \rightarrow Q_B$ практически не зависит от

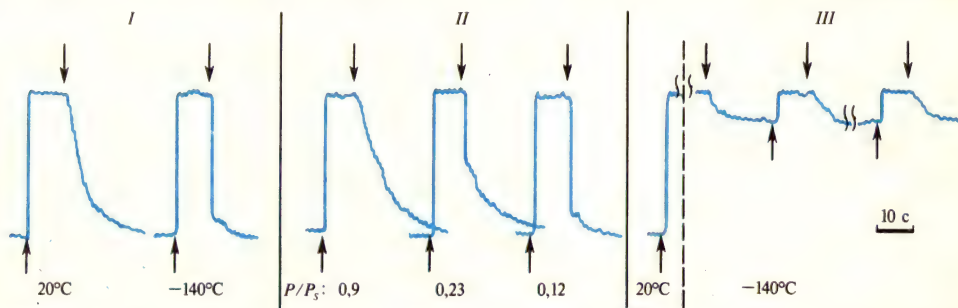


Рис. XXVIII.8. Кинетика темнового восстановления P^+ в реакционном центре хромофоров в зависимости от температуры (I), влажности (II) и при охлаждении препаратов на свету (III) (стрелками вверх и вниз обозначено включение и выключение освещения)

температуры. Следовательно, на свету формируется такое структурное состояние пигмент-белкового комплекса РЦ, в котором перенос $Q_A \rightarrow Q_B$ происходит быстро даже при низких температурах и является поэтому безактивационным. По существу, этому соответствует формирование контактного состояния в паре $Q_A Q_B^-$.

Существованию заселенности двух конформационных состояний, неконтактного ($Q_A Q_B$) и контактного ($Q_A^- Q_B$), соответствуют вклады быстрого и медленного темнового восстановления P^+ (рис. XXVIII.8). Эффективность (N) переноса от Q_A и Q_B пропорциональна отношению заселенностей этих состояний:

$$N \sim Q_A^- Q_B / (Q_A^- Q_B + Q_A Q_B) \quad (\text{XXVIII.3.2})$$

Изменение N с температурой отражает изменение заселенностей этих состояний. В акцепторном комплексе РЦ осуществляется равновесие между состояниями:



Переходы между $Q_A^- Q_B$ и $Q_A Q_B$ требуют преодоления активационного барьера, связанного с подвижностью молекулярных групп (рис. XXVIII.9.).

Значения констант перехода соответственно равны

$$\tilde{x} = x_0 e^{-(\epsilon + \Delta H)/(RT + T\Delta S)}; \quad x = x_0 e^{-\epsilon/(RT)} \quad (\text{XXVIII.3.4})$$

Охлаждение в темноте преимущественно уменьшает константу \tilde{x} по сравнению с x и тем самым сдвигает равновесие (XXVIII.3.3) влево. При $T < 200$ К, когда вообще резко тормозится внутримолекулярная подвижность в белках РЦ (см. рис. XXVIII.6 и XXVIII.7), процесс заселения контактного состояния также резко ингибируется (см. рис. XXVIII.8). Если охлаждение образца в темноте производит с большой скоростью, тогда при каждой температуре новое равновесие в (XXVIII.3.3), соответствующее уменьшенным x и

$Q_A \sim Q_B$, не будет успевать установиться. Вследствие этого в системе образуется повышенная заселенность $Q_A \sim Q_B$ по сравнению с режимом медленного охлаждения.

Другое поведение обнаруживается в системе $PQ_A Q_B$, если охлаждение происходит при одновременном освещении объекта. На свету поддерживается контактное состояние $Q_A \sim Q_B$. Это обусловлено тем, что сродство вторичного хинона в состоянии Q_B , возникающем при освещении, к акцепторному локусу

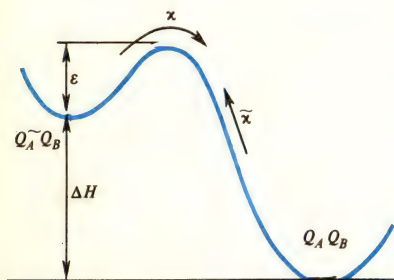


Рис. XXVIII.9. Энергетические уровни контактного ($Q_A \sim Q_B$) и неконтактного ($Q_A Q_B$) состояний

Константы \tilde{x} и x соответствуют конформационным переходам, сопровождающим образование и распад контактного состояния. Значения констант зависят от энергии активации (ϵ) конформационных движений, разности энтальпий (ΔH) и энтропий (ΔS) состояний $Q_A Q_B$ и $Q_A \sim Q_B$. Состояние $Q_A \sim Q_B$ обладает большей энтальпией, но и большей энтропией [ср. (XXVIII.1.2); (XXVIII.2.3)], что делает его в целом энергетически более устойчивым

РЦ, где он получает электроны от Q_A , значительно (на 5—6 порядков) превышает это сродство в состояниях Q_B и $Q_B H_2$ (см. § 9 гл. XXVII). В схеме (XXVIII.3.3) это означает резкое уменьшение константы распада (x) состояния $Q_A \sim Q_B$ по сравнению с распадом состояния $Q_A \sim Q_B$. Поэтому снижение температуры на свету происходит в присутствии образованного семихинонного радикала Q_B , который остается существенно связанным с местом посадки, что препятствует «распаду» контактного состояния, несмотря на понижение температуры. Именно в этих условиях и наблюдается медленное темновое восстановление P^+ от Q^+ (см. рис. XXVIII.8.11).

Движения Q_A и Q_B в $PQ_A Q_B$. Результаты, полученные рядом исследователей, показали, что с понижением температуры скорость рекомбинации P^+ и Q_A^+ может возрасть в 2—3 раза ($\tau_{1/2}$ снижается от 80 до 20 мс), если образец предварительно охлажден в темноте. Если же охлаждение проводили при освещении, то время рекомбинации от температуры не зависело и составляло ~ 60 мс. Очевидно, присоединение электрона к Q_A и образование Q_A^+ исходно равновесной конформации комплекса PQ_A вызывают переход ее в напряженное состояние. Последующая конформационная релаксация включает переполаризацию ближайших к Q_A^+ групп белка и более медленное смещение аниона Q_A^+ в направлении к положительно заряженному иону железа Fe^{2+} в комплексе с Q_B .

С понижением температуры эффект увеличения расстояния между P^+ и Q_A^+ при движении Q_A^+ снижается, что и объясняет аномальное увеличение при этом скорости рекомбинации P^+ и Q_A^+ . Если же охлаждение происходит постепенно и на свету, то в этих условиях образованный Q_A^+ успевает сместиться от P^+ к Q_B . В этом случае скорость рекомбинации P^+ и Q_A^+ уменьшается и становится независимой от температуры. Наблюдаемое в опытах небольшое (на 20%) увеличение скорости реакции рекомбинации P^+ и Q_A^+ при дейтерировании и замещении H_2O на D_2O связано с увеличением вязкости и замедлением движения Q_A^+ , при котором затрагиваются гидратные оболочки белка.

Движение Q_B при образовании контактного состояния можно рассмотреть на основании модели электронно-конформационных взаимодействий, где учитывается изменение конформационного потенциала при изменении зарядового

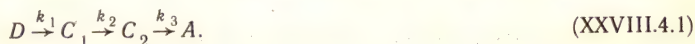
состояния подвижной группы (см. § 8 гл. XIII; рис. XIII.13). Будем считать, что образование контактного состояния $Q_A \sim Q_B$ связано в основном с конформационной подвижностью Q_B , который, двигаясь в конформационном потенциале, приближается к Q_A , принимает от него электрон и переходит в анион-радикальное состояние $Q_B^{\dot{-}}$. В отличие от схемы на рис. XIII.13 $Q_B^{\dot{-}}$ из-за сильной электростатической стабилизации не может покинуть места посадки и практически прекращает свое диффузное движение, оставаясь в комплексе с Q_A . Только после принятия второго электрона, захвата $2H^+$ и восстановления до $Q_B H_2$ вторичный хинон начинает диффундировать в мембране.

Нейтральная дважды восстановленная форма хинона $Q_B H_2$, так же как и форма Q_B , обладает значительной подвижностью и вследствие этого может быстро обмениваться на окисленный хинон мембранного пула. Возможность значительной латеральной диффузии хинона подтверждается данными о том, что коэффициенты диффузии для фосфолипидов составляют $10^{-8} - 10^{-9} \text{ см}^2 \times \text{с}^{-1}$. Это означает, что при двумерной диффузии хинон за 1 мкс смог бы пройти расстояние 0,5—2 нм. При $T \approx 300 \text{ К}$ значение константы скорости переноса электрона в реакции $Q_A^{\dot{-}} \rightarrow Q_B$ составляет $\omega_{Q_A Q_B} \sim 3 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$. Считая, что время (τ_c) конформационной релаксации в (XIII.8.3) характеризует время стохастической диффузии Q_B до места специфического связывания, можно оценить $\tau_c \sim \frac{1}{2} \omega_{Q_A Q_B}$ в области, где наблюдаемая температурная зависимость процесса перехода имеет двухфазный характер. Активационный ход зависимости $\omega_{Q_A Q_B}(T)$ определяется зависимостью $\tau_c \sim e^{-\varepsilon/(RT)}$ и отражает процесс формирования контактного состояния. Согласно данным § 2 этой главы, средняя микровязкость хроматофоров составляет $\eta \approx 10 \text{ Па} \cdot \text{с}$. Будем считать, что диффузионные смещения Q_B связаны с его вращением относительно донорно-акцепторного комплекса $PQ_A^{\dot{-}}$. Отсюда по формуле Дебая для времени вращательной релаксации [$\tau = 4\pi R^3 \eta / (RT)$] находим эффективный гидродинамический радиус хинона Q_B , который составляет $R \approx 1,5 \text{ нм}$, что согласуется со структурными данными.

§ 4. Математические модели первичных процессов переноса электрона в фотосинтезе

Из изложенного в гл. XXVII материала видно, что в фотосинтетических РЦ перенос электрона осуществляется как подвижными переносчиками, так и переносчиками, организованными в молекулярные комплексы. В первом случае процессы транспорта описываются бимолекулярными уравнениями второго порядка, основанными на применении закона действующих масс. Во втором случае математическое описание основывается на уравнениях для вероятностей переходов между разными состояниями молекулярного комплекса; эти состояния включают переносчики в соответствующих окислительно-восстановительных состояниях.

Общий вид уравнений переноса. Математический аппарат, используемый в этих двух типах моделей, был подробно описан в гл. I—IV. Например, реакция переноса электрона между двумя подвижными переносчиками C_1 и C_2 , взаимодействующими в открытой цепи с внешними донором D и акцептором A ,



Кинетические уравнения имеют вид

$$dC_1^{\dot{-}}/dt = k_1 D^{\dot{-}} C_1^0 - k_2 C_1^{\dot{-}} C_2^0; \quad dC_2^{\dot{-}}/dt = k_2 C_1^{\dot{-}} C_2^0 - k_3 C_2^{\dot{-}} A^0, \quad (\text{XXVIII.4.2})$$

где D^1 , C_1^1 , C_2^1 — концентрации восстановленных, а D^0 , C_1^0 , C_2^0 — окисленных форм компонентов цепи, k_1 , k_2 , k_3 — бимолекулярные константы скоростей соответствующих реакций.

Как правило, в цепи (XXVIII. 4.1) общая концентрация переносчиков остается неизменной, т. е. $C_1^1 + C_1^0 = C_{10}$; $C_2^1 + C_2^0 = C_{20}$. Основное условие применения закона действующих масс заключается в том, что редокс-состояния отдельных переносчиков в ЭТЦ независимы. Они определяются лишь окислительно-восстановительным состоянием среды, с которой переносчики находятся в равновесии. Это означает, что в условиях равновесия в темноте исходные концентрации окисленных и восстановленных форм переносчиков задаются окислительно-восстановительным потенциалом среды E_h . А именно, согласно уравнению Нернста,

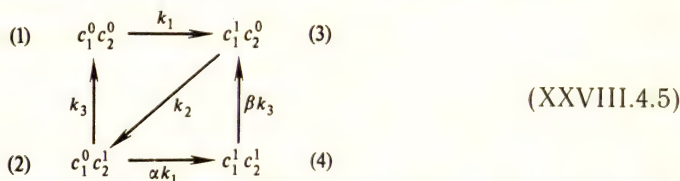
$$E_h = E_{1/2} + (RT/F) \ln(C_1^1/C_1^0) \quad (\text{XXVIII.4.3})$$

или отсюда

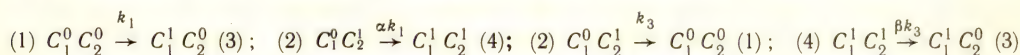
$$C_1^1 = C_{10}/1 - e^{(E_{1/2} - E_h)F/(RT)}, \quad (\text{XXVIII.4.4})$$

где $E_{1/2}$ — нормальный потенциал полувосстановления переносчика, E_h — равновесный окислительно-восстановительный потенциал среды, F — число Фарадея.

Включение света вызывает перенос электрона в соответствии с уравнениями (XXVIII.4.2) при начальных условиях (XXVIII.4.4). Однако независимость редокс-состояний переносчиков нарушается при отсутствии равновесия со средой, например на свету, когда редокс-состояние переносчиков определяется фотоиндуцированным потоком электронов. При наличии кооперативности в переносе электрона в комплексах, когда переносчики влияют друг на друга, их окислительно-восстановительные состояния также становятся взаимозависимыми. В этих случаях применяют описание «в комплексе», которое позволяет учитывать также состояния, отличные от окисленных и восстановленных: протонированные, депротонированные, конформационные. Если перенос электрона по схеме (XXVIII.4.1) осуществляется в комплексе из двух переносчиков, то размеченный граф состояний этого комплекса (C_1 , C_2) будет иметь следующий вид:



Здесь цифры в скобках указывают номер состояния комплекса (C_1 , C_2), k_i — константы скоростей соответствующих переходов, указанных на схеме (XXVIII. 4.1). Кооперативность в переносе может проявляться в том, что константы скоростей переходов между состояниями комплекса зависят от состояний переносчиков, не принимающих непосредственного участия в реакции. В (XXVIII.4.5) степень кооперативности для переходов



характеризуется параметрами α и β , которые показывают, как зависит процесс восстановления C_1 или окисления C_2 от редокс-состояний переносчиков (C_1) или (C_2) соответственно. При $\alpha = \beta = 1$ кооперативность отсутствует; система дифференциальных уравнений в этом случае для вероятностей

состояний комплекса (C_1C_2) в схеме (XXVIII.4.1) имеет вид

$$\begin{aligned} dp_1/dt &= k_3p_2 - k_1p_1; \quad dp_3/dt = k_1p_1 + k_3p_4 - k_2p_3; \quad dp_2/dt = k_2p_3 - (k_1 + k_3)p_2; \\ dp_4/dt &= k_1p_2 - k_3p_4; \quad \sum_{i=1}^4 p_i = 1. \end{aligned} \quad (\text{XXVIII.4.6})$$

Решив систему уравнений (XXVIII.4.6) относительно вероятностей P_i состояний комплекса (C_1C_2), можно найти вероятности состояний отдельных переносчиков. Для этого надо просуммировать вероятности всех тех состояний комплекса, в которых рассматриваемый переносчик находится в интересующем нас состоянии. Так, вероятность того, что первый переносчик находится в окисленном состоянии C_1^0 , равна сумме вероятностей состояний (1) и (2) комплекса в схеме (XXVIII.4.5):

$$p(C_1^0) = p(C_1^0C_2^0) + p(C_1^0C_2^1) = p_1 + p_2 = 1 - p(C_1^1). \quad (\text{XXVIII.4.7})$$

Суммарная скорость (v) переноса электрона между C_1 и C_2 в комплексе пропорциональна концентрации комплексов, находящихся в состоянии $C_1C_2^0$ ($v = k_2[C_1C_2^0]$). Здесь в едином акте происходит как окисление C_1 , так и восстановление C_2^0 . Поэтому, если оба переносчика, входящие в комплекс, либо окислены, либо восстановлены, переноса электрона между ними нет. Следовательно, компоненты одного и того же комплекса взаимодействуют между собой, а отдельные комплексы изолированы друг от друга. В фотосинтезе это соответствует параллельным изолированным цепям переноса электронов.

В бимолекулярных реакциях, протекающих в растворах для восстановления переносчика C_1^1 , всегда найдется окисленный C_2^0 , между которыми и произойдет перенос электрона.

В фотосинтетической цепи переноса электронный поток запускается при поглощении кванта света фотоактивным пигментом P , чему соответствует «световая» константа скорости (k_0) генерации возбуждаемых молекул P^* .

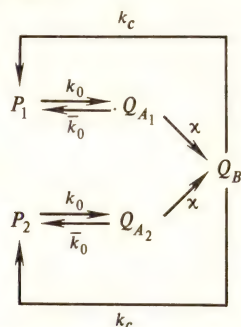
В схеме функционирования РЦ [см. (XXVII. 4.1)] для перехода



k_0 равна произведению интенсивности (I) падающего света на сечение поглощения (σ): $k_0 = I\sigma$ (с^{-1}). На прямом солнечном свету I_{max} составляет $\sim 10^{16}$ квант·см $^{-2}$ ·с $^{-1}$ и $\sigma \sim 10^{-16}$ см 2 . В этом случае значение k_0 близко к единице (см. § 3 гл. XXVII). Следовательно, на постоянном свету значение k_0 лимитируется интенсивностью света или частотой попадания квантов в РЦ. Истинные времена и константы переноса электрона в ЭТЦ можно определить в условиях, когда интенсивность света не является лимитирующим фактором. Это достигается (см. гл. XXVII) при возбуждении короткими лазерными импульсами длительностью 10^{-11} с мощностью 10^{22} — 10^{25} квант·с $^{-1}$ (или 10^{11} — 10^{14} квант в импульсе).

Модель переноса в комплексе PQ_AQ_B . На основании данных о функционировании ЭТЦ составляются математические модели, описывающие окислительно-восстановительные превращения переносчиков. Результаты теоретического исследования свойств математической модели позволяют описать зависимость стационарных концентраций и переходных кривых редокс-превращений переносчиков при включении и выключении возбуждающего света от значений констант переноса и, в частности, от величины k_0 . Сопоставление этих результатов с экспериментальными данными дает возможность не только проверить справедливость исходных предположений о характере функциональной организации ЭТЦ, но и определить значения констант переноса и соотношение между ними на отдельных участках цепи.

В искусственных модельных системах наблюдается образование дважды восстановленного Q_B^{2-} , которое не может происходить в полностью изолированных РЦ при наличии в них одного электрона. Поэтому появление Q_B^{2-} обеспечивается в этом случае как за счет восстановления P^+ от внешнего донора, так и за счет взаимодействия в фотосинтетической мембране по крайней мере двух ЭТЦ на уровне вторичных акцепторов:

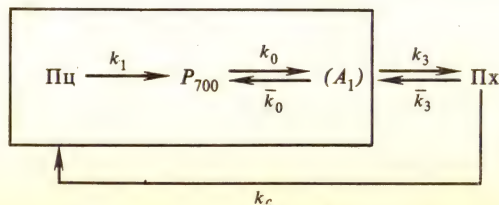


(XXVIII.4.8)

На модели переноса «в комплексе» (XXVIII.4.8) были получены кинетические переходные кривые нарастания концентрации пигмента в окисленной (P^+) и хинонных акцепторов в восстановленной ($Q_A^- + Q_B^- - Q_B^{2-}$) формах при световом возбуждении ($k_0=10$), а также кривые уменьшения этих же концентраций при темновой релаксации после выключения света ($k_0=0$). Особенностью кинетических кривых окисления пигмента и восстановления хинонов является то, что на свету степень окисленности пигмента быстро достигает своего стационарного значения. В то же время кривая восстановления хинонов характеризуется индукционным максимумом (рис. XXVIII. 10). Удовлетворительное совпадение теоретических и экспериментальных кривых (рис. XXVIII.10) имеет место, если только константа \bar{k}_0 рекомбинации Q_A и P на свету ($k_0=10$) по крайней мере на 1—2 порядка меньше этой же константы \bar{k}_0 в темноте ($k_0=0$). Этот вывод, полученный на основе анализа математической модели, совпадает с результатами изучения конформационных переходов в комплексе PQ_AQ_B при формировании контактных состояний.

В темноте возврат электрона на P^+ от Q_A^- идет безактивационно по механизму слабой электронно-колебательной связи (см. рис. XIII.8), где энергия реорганизации (E_r) равна тепловому эффекту реакции ΔE или разности $(E_{1/2})$ окислительно-восстановительных потенциалов P и Q_A , т. е. $E_r \approx \Delta E \approx 0,6$ эВ. Уменьшение значения константы скорости на свету на два порядка может быть вызвано увеличением E_r до 1 эВ [см. (XIII.6.6)]. Главный вклад в энергию реорганизации этой реакции могут давать низкочастотные ядерные моды с широким распределением частот около $\omega = 100 \text{ см}^{-1}$.

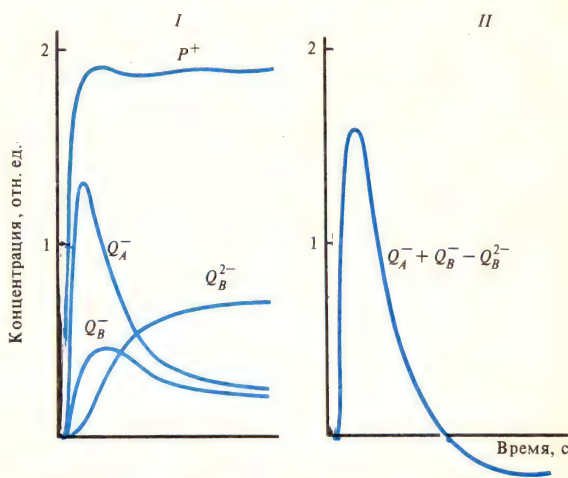
Модель переноса в ФС I. Моделирование ЭТЦ фотосинтеза высших растений включает анализ кинетики переноса электрона в ФС I, протекающий по схеме



(XXVIII.4.9)

Здесь A_1 — комплекс первичных акцепторов, включающий хлорофилл Хла_{695} и железосерные белки (X, A, B); Пх — пластохинон, подвижный переносчик; Пц — пластоцианин — переносчик, образующий единый комплекс с P_{700} и A_1 . Для описания функционирования цепи (XXVIII.4.9) необходимо учитывать реакции «в комплексе» $[\text{Пц } P_{700} A_1]$ и бимолекуляр-

Рис. XXVIII.10. Кинетические кривые концентрации компонентов $P^+, Q_A^-, Q_B^-, Q_B^{2-}$ (I) и $Q_A^- + Q_B^- + Q_B^{2-}$ (II), полученные для модели (XXVIII.4.8) на ЭВМ при $k_0=10, \kappa_1=1, k_c=0,14$ (объяснение см. в тексте)

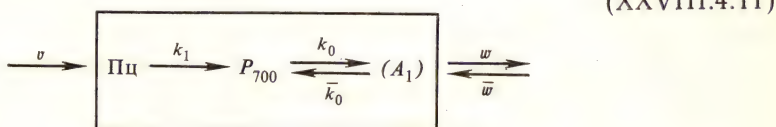


ные реакции Пх . Уравнение для концентраций молекул Пх в восстановленной форме имеет вид

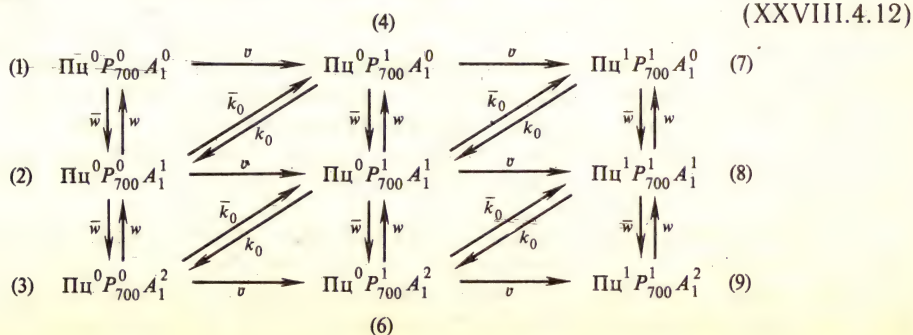
$$d[\text{Пх}]/dt = -k_c [\text{Пх}^1] [\text{Пц}^0] - \bar{k}_3 [\text{Пх}^1] [A_1^0] + k_3 [\text{Пх}^0] [A_1^1]. \quad (\text{XXVIII.4.10})$$

Обозначим приток v и \bar{w} электронов в комплексе $\kappa = k_c [\text{Пх}^1]$, $\bar{w} = \bar{k}_3 [\text{Пх}^1]$ и отток электронов $w = k_3 [\text{Пх}^0]$.

Тогда реакции (XXVIII.4.9) в комплексе переписутся как



Поскольку k_1 больше всех других констант, а A_1 имеет возможность двухэлектронного восстановления, схема состояний комплекса $[\text{Пц } P_{700} A_1]$ имеет вид

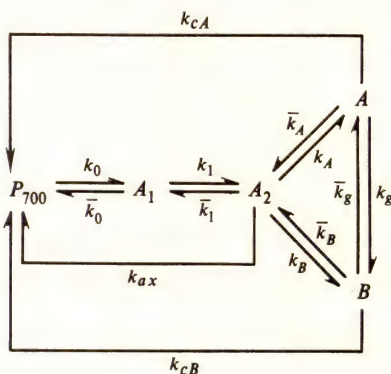


Система дифференциальных уравнений для перехода в графе состояний (XXVIII.4.12) имеет вид

$$\begin{aligned} dp_1/dt &= -(v + \bar{w})p_1 + wp_2; & dp_2/dt &= -(v + k_0 + \bar{w} + \bar{w})p_2 + \bar{w}p_1 + wp_3 + k_0p_4; \\ dp_0/dt &= -wp_9 + \bar{w}p_8 + vp_6; & \sum_{i=1}^9 p_i &= 1. \end{aligned} \quad (\text{XXVIII.4.13})$$

Соответствие экспериментально измеренных и теоретически рассчитанных скоростей процессов фотоокисления и темнового восстановления P_{700} имеет место только в том случае, когда константы взаимодействия Px с комплексом $[PcP_{700}A_1]$ на свету (при $k_0=10$) и в темноте (при $k_0=0$) различаются не менее чем на порядок.

Оценка констант взаимодействия железосерных центров с окисленным P_{700} была сделана при моделировании переноса электрона в системе первичных акцепторов FCI:



Оказалось, что соответствие с экспериментом, проведенным при $T \leq 200$ К, достигается в модели, если значения констант k_g и \bar{k}_g много меньше констант на остальных участках цепи, т. е. $k_g, \bar{k}_g \ll k_i$. Кроме того, на свету ($k_0=100$) константа возврата электрона ($k_{cX} \sim 10$ с $^{-1}$) от X должна быть на два порядка больше, чем в темновых условиях ($k_{cX} \sim 10^{-1}$ с $^{-1}$ при $k_0=0$). Возможно, в регуляции скорости возврата электрона на участке $A_2 \rightarrow P_{700}$ играют роль конформационные движения железосерных белков. Значения энергии реорганизации E_r для реакций $Pc \rightarrow P_{700}, A_2 \rightarrow P_{700}$ составляют $E_r \sim 2,2$ эВ и 2,9 эВ соответственно.

Как известно, переносчики Pc и железосерные центры содержат ионы переходных металлов: Cu и Fe. Колебательные степени свободы, связанные с полярными группами вблизи ионов этих металлов, могут давать существенный вклад в энергию реорганизации. Так, окисление в Pc и переход иона меди из Cu^+ в Cu^{2+} сопровождается уменьшением ионного радиуса и соответствующим уменьшением длин связей Cu с двумя атомами азота двух гистидиновых остатков в Pc . Расчет показывает, что вклад в E_r от упругости координационной сферы иона Cu составляет $\sim 0,5 \div 0,6$ эВ. Аналогичный вклад в E_r дает деформация кластера железосерных белков с изменением ионного радиуса Fe на 0,01 нм и его полярного окружения.

Таким образом, построение и исследование кинетических моделей переноса электрона и идентификация их параметров в различных экспериментальных условиях дополняют представления о физических механизмах и путях регуляции электронного транспорта в цепи фотосинтеза.

§ 5. Вероятностная модель переноса электрона в многокомпонентном реакционном центре

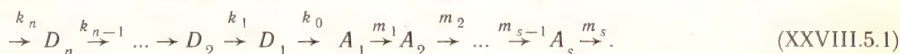
Фотосинтетический РЦ представляет собой «молекулярную машину», в которой значения констант скоростей переноса на отдельных участках строго согласованы между собой. Анализ математической модели переноса электрона в абстрактном фотосинтетическом РЦ позволяет понять смысл иерархии констант скоростей переноса. В модели учитываются общие черты всех РЦ.

1) Ближайшее донорно-акцепторное окружение РЦ представляет собой единый структурный пигмент-белковый комплекс молекул переносчиков, в котором задана жесткая последовательность переноса электрона.

2) Нормальные окислительно-восстановительные потенциалы соседних переносчиков электронов, находящихся в донорной (D_1, D_2, \dots, D_n) и акцепторной (A_1, A_2, \dots, A_s) части РЦ, отличаются, как правило, не менее чем на 60—100 мВ. Это означает, что при анализе общих закономерностей кинетики переноса электрона в РЦ можно пренебречь реакциями обратного переноса. Кроме того, нормальные окислительно-восстановительные потенциалы переносчиков D_1, D_2, \dots, D_n выше потенциалов переносчиков A_1, A_2, \dots, A_s .

3) Значения констант скорости переноса электрона на соседних участках донорной и акцепторной частей РЦ отличаются друг от друга не менее чем на два порядка.

Предположим, что реакции взаимодействия РЦ с внешним донором D и акцептором A также являются необратимыми, причем концентрации D и A существенно превосходят концентрацию РЦ. С учетом перечисленных предположений схему переноса электронов можно представить как последовательность необратимых стадий переноса электрона:



Для значений констант скоростей здесь справедливы соотношения: $k_{i-1} \gg k_i (i=1, 2, \dots, n)$; $m_{j-1} \gg m_j (j=2, \dots, s)$. Для вероятностей $p_r(t)$ состояний комплекса переносчиков, изображенных на схеме (XXVIII.5.1), можно записать систему типа (IV.2.6):

$$dp/dt = \sum_{j=1}^l (k_{jr} p_j - k_{rj} p_r), \quad r=1, \dots, l. \quad (\text{XXVIII.5.2})$$

Здесь k_{jr} — константа скорости переноса электрона, соответствующая переходу между j -м и r -м состояниями РЦ. Решив эту систему уравнений с соответствующими начальными условиями, можно найти вероятность окислительно-восстановительных состояний отдельных компонентов РЦ после суммирования вероятностей всех тех состояний комплекса, в которые входит этот переносчик в интересующем нас редокс-состоянии, подобно тому, как это сделано в формулах (IV.2.8; IV.2.9.) или (XXVIII.4.6).

В общем случае число возможных состояний комплекса РЦ составляет 2^{n+s} , где n — число донорных, а s — акцепторных компонентов комплекса. Перечисленные выше свойства РЦ позволяют существенно упростить систему. В результате становится возможным получить аналитические решения для стационарных значений редокс-состояний комплекса.

Фотосинтетический РЦ рассматривают как систему, симметричную относительно первичной донорно-акцепторной пары $D_1 \rightarrow A_1$. Первичное разделение заряда инициирует два процесса: перенос электрона в акцептор-

ной части и заполнение освободившегося места в донорной части — перенос «дырки» от D_1 к внешнему донору. В случае нециклического транспорта [см. (XXVIII.5.1)] оба процесса независимы. Это обстоятельство, а также учет иерархии констант дает возможность в случае импульсного возбуждения описать кинетику переноса электрона простыми соотношениями, в которые входят лишь константы скорости переноса электрона на участках, непосредственно примыкающих к рассматриваемому переносчику. Так, для переносчиков на донорной стороне приближенно $p(D_q^0, t) \simeq \exp(k_q t) - \exp(k_{q-1} t)$, ($q = 2, 3, \dots, n$); $p(D_1^0, t) \simeq \exp(k_1 t)$. (XXVIII.5.3)

Здесь $p(D_q^0, t)$ — вероятность нахождения q -го переносчика в окисленном состоянии. Для переносчиков на акцепторной стороне

$$p(A_j^1, t) = \exp(-m_j t) - \exp(m_{j-1} t), \quad j = 2, 3, \dots, s; \quad p(A_1^1, t) = \exp(m_1 t). \quad (XXVIII.5.4)$$

Здесь $p(A_j^1, t)$ — вероятность нахождения j -го переносчика в восстановленном состоянии.

Из этих формул вытекает, что время жизни переносчиков электронов в неравновесных состояниях после вспышки света тем меньше, чем ближе данный переносчик электрона к начальной световой стадии в цепи переноса электрона. Такая функциональная организация фотосинтетического РЦ позволяет ему, с одной стороны, быстро приходить в реакционноспособное состояние после прихода очередного кванта, с другой — производить разделение и стабилизацию зарядов.

Таким образом, функционирование РЦ как «молекулярной машины», преобразующей случайные потоки электронов и квантов света в направленный поток электронов, обеспечивается соотношением констант скорости, когда однозначно задаются последовательность и направление переноса.

Рассмотрение стационарного потока электронов через РЦ показало, что для значения стационарной скорости переноса электрона (v) через комплекс справедливо неравенство $(1/k + 1/k_0 + 1/m)^{-1} \leq v \leq \min(k, k_0, m)$.

Здесь k и m — константы скорости притока электронов в комплекс и оттока из комплекса, k_0 — световая константа.

На временах, сравнимых с временами обмена электронами РЦ со средой, стационарные характеристики нециклического транспорта электронов определяются лишь световой константой и константами скорости обмена РЦ со средой.

При освещении образца происходит окисление донорных компонентов и восстановление акцепторных. При этом сначала окисляется самый далекий от световой стадии переносчик D_n , затем более близкий D_{n-1} и т. д. Аналогично, сначала восстанавливается A_s , затем A_{s-1} и т. д. Это — следствие иерархии констант скоростей отдельных стадий переноса электрона в РЦ.

Характер переходных процессов при освещении зависит от соотношения констант скоростей обмена электронами с внешней средой: k и m . Если $k > m$, при включении света наблюдается немонотонное окисление переносчиков электронов на донорной стороне РЦ и монотонное восстановление акцепторов. Если $k < m$, доноры окисляются монотонно, а восстановление акцепторов протекает немонотонно. При выключении действующего света происходит восстановление переносчиков D_1, \dots, D_n и окисление A_1, \dots, A_s . Характерной особенностью этих процессов является временная задержка в темновом восстановлении (окислении), тем большая, чем дальше переносчик электронов находится от собственно световой стадии разделения зарядов.

Х

Первичные фотопроцессы в биологических системах



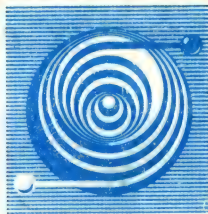
XXIX

Фотопревращения
бактериородопсина
и родопсина

XXX

Фоторегуляторные
и фотодеструктивные
процессы

Фотопревращения бактериородопсина и родопсина



Исследования молекулярных механизмов фотопревращений родопсина и бактериородопсина представляют собой важную область биофизики фотобиологических процессов, которая особенно бурно развивается в последние годы. Бактериородопсин (Бр) был обнаружен в пурпурной мембране галофильных бактерий (В. Стокениус, 1971), которая оказалась новым типом биологической мембраны, способной преобразовывать энергию света. Эта система, видимо, является наиболее простой из всех изученных систем запасаения световой энергии в форме разности электрохимических потенциалов H^+ . Каждая молекула Бр содержит один хромофор-ретиаль (полиеновый альдегид) в комплексе с белком — опсином — единственным белком, который содержится в пурпурной мембране. Опсин использует энергию света для активного перемещения протонов через мембрану, в результате чего происходит синтез АТФ и обеспечивается выполнение других физиологических функций. В основе этого биоэнергетического процесса лежит фотохимический цикл превращений Бр.

Зрительный пигмент родопсин, так же как и бактериородопсин, — практически единственный белок в фоторецепторной мембране зрительной клетки сетчатки глаза (на его долю приходится до 80% всего белка в мембране). Хромофором родопсина также служит ретиаль, находящийся в комплексе с опсином. Фотопревращения родопсина тесно сопряжены с ионными и ферментативными процессами, лежащими в основе зрительной рецепции, а также с возникновением трансмембранной разности потенциалов на фоторецепторной мембране за счет сдвига протона в мембране.

По целому ряду свойств родопсин и бактериородопсин схожи (аминокислотный состав, молекулярная масса, химическая природа хромофора). Общие черты присущи и процессам фотохимических превращений, особенно на первых стадиях. Как будет показано в настоящей главе, первичные механизмы фотопревращений бактериородопсина и родопсина сходны также и с процессами, проходящими в РЦ фотосинтеза (см. гл. XXVIII.) Эти механизмы включают фотоиндуцированные конформационные изменения в белковой части фоточувствительного хромопротеина, осуществляющиеся согласно принципу электронно-конформационных взаимодействий.

§ 1. Структура и функции пурпурных мембран

Пурпурные мембраны (ПМ), локализованные в цитоплазме клеток некоторых экстремально галофильных бактерий, например *Halobacterium halobium*, содержат единственный гидрофобный пигмент — белковый комплекс (ПБК) бактериородопсин, молекулы которого располагаются в ПМ строго упорядоченно.

Согласно электронно-микроскопическим данным, ПМ в интактных клетках и в изолированных препаратах представляют собой дискообразные образования диаметром около 0,5 мкм и толщиной 5–6 нм. Бр расположен в ПМ симметричными группами по три молекулы, причем каждый такой тример стабилизирован 12–14 молекулами структурных липидов. Размер ячейки составляет около 0,6 нм. Тримеры, в свою очередь, образуют двумерную гексагональную «кристаллическую» решетку в плоскости ПМ с периодом 6,3 нм.

Изучение химического состава ПМ показало, что они на 75% состоят из белка и на 25% из липидов. 60% липидов представлено фосфолипидами, подавляющая часть остальных — гликолипидами. 15% от всех липидов ПМ составляют фосфатидилглицеросульфат и гликолипидсульфат, характерные исключительно для ПМ. Единственным белком ПМ является сильно гидрофобный ПБК — бактериородопсин (молекулярная масса ~26 000). Данные спектров кругового дихроизма в УФ-области свидетельствуют о высокой степени α -спирализации белковой цепи Бр (75–80% α -спирализации). Хромофор белка — ретиналь — содержится в белке в молярном соотношении 1:1, т. е. на каждую белковую цепь приходится один ретиналь.

Трехмерная структура молекулы Бр в ПМ расшифрована с помощью метода дифракции электронов (рис. XXIX.1). Согласно этим данным, одна молекула Бр содержит 7 α -спиральных участков, пронизывающих ПМ. Три из этих «столбов» расположены почти перпендикулярно плоскости мембраны, остальные четыре образуют небольшие углы с нормалью к плоскости мембраны. С помощью комплекса физико-химических и биохимических методов определено, что ретиналь ковалентно связан с опсином и образует альдиминную связь с одним из остатков лизина в белковой цепи (так называемое шиффово основание; рис. XXIX.2).

Тщательный биохимический анализ молекулы Бр, проведенный в Институте биоорганической химии АН СССР, позволил

расшифровать первичную последовательность аминокислот в белковой цепи (Ю. А. Овчинников, Н. Г. Абдулаев, 1978), а также определить расположение молекулы Бр в ПМ. Концевая COOH -группа белковой молекулы находится на цитоплазматической стороне мембраны, а NH_2 -группа — на внешней стороне (рис. XXIX.3).

Ретиналь в Бр прикреплен к *лиз*-216, находящемуся в конце седьмого (от N-конца белковой цепи) α -спирального столба (рис. XXIX.3). Место прикрепления ретиналя к белку расположено ближе к цитоплазматической стороне ПМ — на расстоянии 0,6–1,0 нм от поверхности, в то время как иононовое кольцо ретиналя находится внутри мембраны, почти в ее центре. Эксперименты по дифракции нейтронов на препаратах ПМ с дейтерированным ретиналем показали, что величина угла между переходным дипольным моментом ретиналя, практически совпадающим с его длинной осью, и плоскостью ПМ лежит в диапазоне 19° – 25° .

Макромолекулы Бр гораздо менее подвижны, чем другие мембранные белки. Из температурной зависимости спектров кругового дихроизма ПМ видно, что при температурах выше 30°C взаимодействие молекул Бр внутри

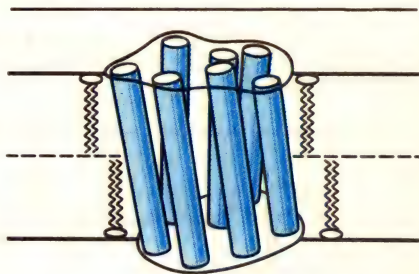


Рис. XXIX.1. Трехмерная структура молекулы бактериородопсина (по R. Henderson, 1975)

тримеров практически исчезает и в ПМ существует только мономерная форма Бр.

В спектре поглощения ПМ один из максимумов, расположенный около 280 нм, соответствует поглощению ароматических аминокислот в белке. В модельных системах максимум поглощения шиффова основания в протонированной форме находится около 440 нм, в непротонированной — около 360 нм. Однако в Бр максимумы, соответствующие протониро-

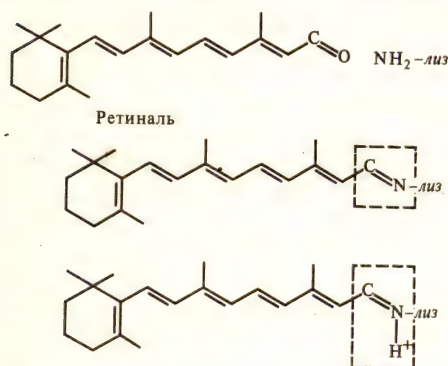


Рис. XXIX.2. Образование альдиминовой связи между ретиналем и лизином в белковой цепи

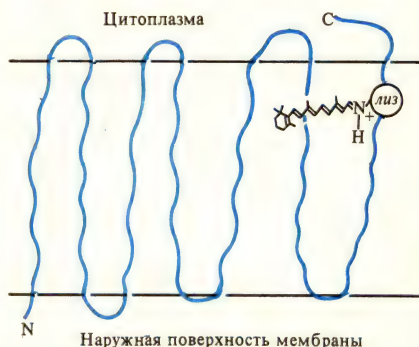


Рис. XXIX.3. Место прикрепления ретиналя в бактериородопсине

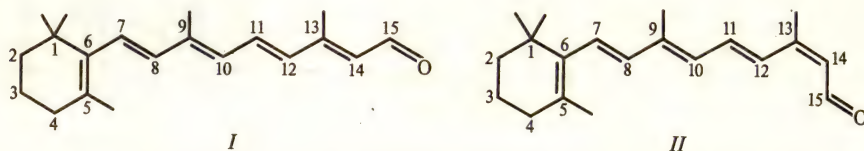


Рис. XXIX.4. Структурные формулы полностью транс-ретиналя (I) и 13-цис-ретиналя (II)

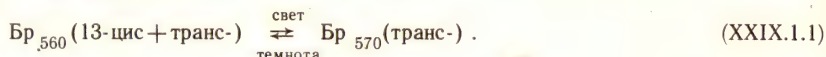
ванной форме шиффова основания, расположены около 560—570 нм, а непротонированной — около 412 нм. Причиной такого различия может быть сильное хромофор-белковое взаимодействие, значительную роль в котором играют ароматические аминокислоты.

Обработка ПМ сильными детергентами нарушает взаимодействие ретиналя с бактериоопсином, в результате чего максимум поглощения сдвигается в коротковолновую сторону до 370 нм, что соответствует поглощению ретиналя с депротонированным шиффовым основанием. Ретиналь можно обратимо удалять из ПМ с помощью гидроксиламина. В его присутствии максимум поглощения Бр сдвигается до 360 нм, что соответствует появлению свободного ретинальоксима, который можно экстрагировать с помощью органических растворителей.

Бр в ПМ может находиться в двух различных состояниях: после адаптации к темноте или к свету. Эти состояния отличаются по спектрам поглощения Бр. Максимум полосы поглощения Бр в образцах, адаптированных к темноте, расположен около 560 нм. После освещения максимум сдвигается до 570 нм. По данным химических анализов,

ПМ, адаптированные к темноте, содержат эквивалентные количества молекул Бр, имеющих ретиналь в 13-цис-и полностью транс-формах. Светоадаптированные ПМ содержат Бр только с полностью транс-ретиналем (рис. XXIX.4).

Изомеры Бр (13-цис-и транс-) при возбуждении светом вовлекаются в различные циклы превращений. В темноте наблюдается медленный процесс релаксации части Бр (транс-) в Бр (13-цис) до достижения темноадаптированного состояния. Скорость изомеризации обладает сильной температурной зависимостью



§ 2. Фотоцикл бактериородопсина

Первые исследования цикла фотоиндуцированных превращений Бр в суспензии ПМ при комнатной температуре, выполненные методом импульсной абсорбционной спектроскопии, показали наличие шести промежуточных состояний. Каждое из этих состояний, обозначаемых буквами латинского алфавита от *K* до *O* в порядке возрастания длительности жизни, характеризуется определенными спектральными свойствами. Последовательность переходов между обнаруженными состояниями активированного Бр представлена на рис. XXIX.5. Образующаяся вслед за поглощением света форма K_{610} при температурах ниже 140 К является стабильной (Ф. Ф. Литвин, 1975). Однако она фотоактивна и может быть переведена обратно в исходное состояние Бр_{570} (транс-) воздействием красного света с длиной волны > 630 нм. Установлена независимость от температуры (в интервале от 77 до 9 К) фотоиндуцированного перехода $\text{Бр}_{570\text{-транс}} \rightarrow K_{610}$ и обратной реакции, квантовые выходы которых равны соответственно 0,3 и 0,7. Исходная форма Бр_{570} содержит ретиналь только в транс-конфигурации, а уже на стадии интермедиата M_{412} ретиналь находится в полностью 13-цис-состоянии. Однако процесс изомеризации завершается еще раньше к моменту образования формы L_{550} , из которой удалось выделить ретиналь в 13-цис-состоянии (см. § 4 этой главы).

Перенос протона. Образование промежуточной формы M_{412} в фотоцикле Бр, по многочисленным данным, связано с переносом протона через мембрану. Процесс образования M_{412} сопряжен с освобождением протона и выходом его во внешнюю среду. Распад формы M_{412} сопровождается связыванием протона на другой стороне мембраны (В. Стокениус и др., 1979). Эксперименты с применением рН-индикаторных красителей на модельных системах (замкнутые везикулы, содержащие ПМ в такой же ориентации, как и в нативной клетке) показали, что выброс протона происходит на внешней стороне ПМ, а захват — на цитоплазматической. Следовательно, наблюдающееся закисление среды суспендирования клеток галобактерий при их освещении обусловлено выходом протонов при функционировании протонной помпы, роль которой выполняет Бр. Кроме того, при освещении суспензии галобактерий наблюдается увеличение содержания АТФ в клетках и торможение дыхания. Процессы фотоиндуцированного переноса протонов через ПМ включают электрогенные стадии, протекание которых сопровождается образованием на мембране фотопотенциала.

В темноте время разрядки установившегося на свету протонного градиента довольно велико (секунды). Это еще раз подтверждает, что выброс и связывание протона в течение цикла действительно происходит на разных сторонах мембраны. В процесс транслокации протонов вовлекается, очевидно, шиффово основание, подвергающееся протонированию — депротони-

рованию (см. § 4 этой главы). Так, метод резонансной спектроскопии комбинационного рассеяния (или рамановской спектроскопии) позволил продемонстрировать, что шиффово основание (см. рис. XXIX.2) в исходном Бр₅₇₀ протонировано, в то время как М₄₁₂ содержит шиффово основание в непротонированной форме. Процесс распада М₄₁₂ при возвращении в

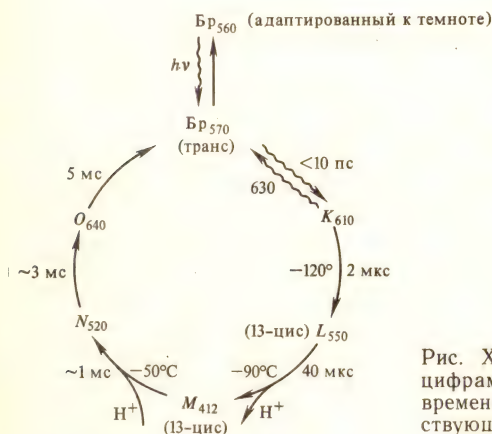


Рис. XXIX.5. Фотохимический цикл бактериородопсина: цифрами указаны положения максимумов поглощения, времена жизни и нижние температурные пределы соответствующих переходов; остальные пояснения см. в тексте

исходное состояние Бр₅₇₀ сопровождается протонированием шиффова основания. Непосредственный перенос протона через мембрану может осуществляться вдоль цепи из аминокислотных остатков за счет последовательных актов протонирования—депротонирования.

Электрический потенциал на мембране влияет на превращения формы М₄₁₂ и связанный с ними перенос протона. Установлено, что эффективность работы протонного насоса ПМ зависит от концентрации солей в среде, т. е. процесс переноса протона контролируется поверхностным электрическим потенциалом, существующим на мембране. Методом регистрации обратимого связывания спинового зонда, несущего положительный заряд, показана корреляция амплитуды и кинетики изменений поверхностного потенциала с соответствующими параметрами стадии М₄₁₂.

Фотостационарная концентрация формы М₄₁₂ и кинетика темнового распада этого промежуточного состояния Бр в реконструированных липосомах сильно зависят от электрической составляющей и в гораздо меньшей степени — от электронной составляющей электрохимического градиента Н⁺. По-видимому, в поле мембранного потенциала затрудняется процесс трансмембранного переноса протона, а также его присоединение к депротонированному шиффову основанию. Причина этого может заключаться в конформационных изменениях ПБК в электрическом поле, которые препятствуют переносу протона (см. § 3 этой главы).

Роль ПМ как протонной помпы проявляется в зависимости от скорости фотопревращений и других характеристик Бр от рН. При рН < 6 скорость темновой адаптации, т. е. транс-цис-изомеризации ретиналя [см. (XXIX.1.1.)], увеличивается. Изменение рН меняет кинетику самого цикла. Так, форма О₆₄₀ регистрируется при низких рН и почти исчезает при щелочных. Образование формы М₄₁₂ при высоких рН ускоряется. Эти эффекты могут быть обусловлены изменением состояния протонирования вторич-

ных донорных и акцепторных групп в цепи переноса протона, но группы эти не идентифицированы. При pH 8 выброс протона во внешнюю среду происходит раньше захвата протона на другой стороне мембраны. При этом выброс слегка запаздывает по отношению к образованию M_{412} , а захват соответствует регенерации исходного Br_{570} . При pH 5 захват протона осуществляется раньше его выброса во внешнюю среду.

Роль белка в функционировании Бр. Спектры поглощения и флуоресценции Бр в УФ-области характеризуют состояния бактериоопсина на разных стадиях протекания фотоцикла.

В спектре флуоресценции Бр в ПМ при комнатной температуре наблюдается широкая полоса с максимумом вблизи 320 нм, принадлежащая остаткам ароматических аминокислот (*три, тир*) в белковой части комплекса. При активации фотоцикла наблюдается уменьшение выхода флуоресценции, степень которого неодинакова в различных частях спектра. Кинетика фотоиндуцированных изменений флуоресценции Бр хорошо соответствует кинетике его фотоиндуцированных изменений поглощения при 410 нм, которые отражают процессы образования и распада формы M_{412} . Это указывает на связь стадии M_{412} нормального фотоцикла с изменением состояния ароматических аминокислотных остатков в Бр. Предполагают, что спектральные эффекты могут определяться изменениями пространственного расположения триптофанилов в структуре макромолекулы (переход из одного окружения в другое), эффективности их взаимодействия с ретиналом и т. д.

Данные по абсорбционной спектроскопии Бр в УФ-диапазоне находятся в согласии с этими предположениями. В экспериментах, выполненных с применением методов импульсного фотолиза (Б. Хесс, 1972), обнаружено, что активация фотоцикла Бр вызывает уменьшение поглощения при 275 нм и увеличение при 295 нм. Считают, что увеличение поглощения при 295 нм вызвано диссоциацией одного или двух остатков тирозина при одновременном перераспределении электронной плотности по остаткам триптофана, а уменьшение поглощения при 275 нм — изменением поляризационного состояния в окружении указанных ароматических аминокислот.

Иммобилизация Бр имидами, осуществляющими сшивки в макромолекуле, приводит к замедлению фотоцикла и одновременно блокирует перенос протона. Это прямо указывает на необходимость конформационных перестроек бактериоопсина в течение фотоцикла и на их важность для функционирования макромолекулярного комплекса Бр в качестве протонной помпы.

Обработка ПМ детергентом Тритон X-100, действующим на структурные липиды, приводит к разрушению тримеров и переходу Бр в мономерную форму. Это сопровождается существенным угнетением эффективности изомеризации ретиналя. Предварительная обработка суспензии ПМ глутаровым альдегидом, сшивающим макромолекулы между собой, снимает действие детергента. В результате способность Бр к световой адаптации сохраняется вследствие присутствия большого количества фиксированных тримеров.

§ 3. Модельные системы, содержащие бактериородопсин

В экспериментальных исследованиях принципов функционирования Бр широкое применение нашли разнообразные модельные системы и особенно пленки ПМ. На этих объектах изучают преобразование световой энергии в электростатическую энергию разделенных зарядов и энергию поляризации макро-

молекулярных компонентов Бр. Найдено, что внешнее электрическое поле напряженностью 10^7 В·м⁻¹, приложенное в темноте при комнатной температуре к пленке ПМ, вызывает обратимые изменения спектра поглощения Бр. Соответствующий дифференциальный спектр указывает на длинноволновый сдвиг полосы поглощения Бр под влиянием электрического поля и характеризуется отрицательной полосой в области 430–580 нм со слабо

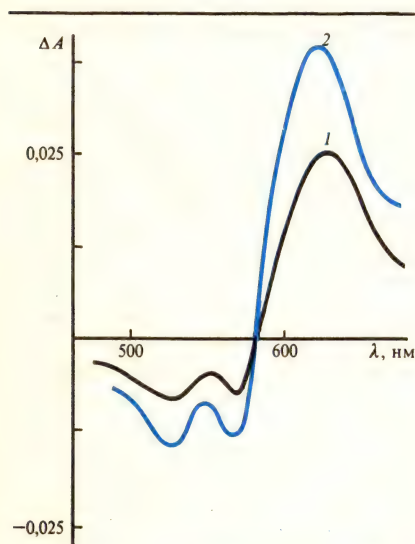


Рис. XXIX.6. Дифференциальный спектр изменений поглощения бактериородопсина, индуцированных электрическими полями (1) и светом при -190°C (2)

выраженной структурой и интенсивной широкой положительной полосой с максимумом около 630 нм (рис. XXIX.6). Полученное электроиндуцированное состояние Бр спектрально подобно первому продукту (батопформа) нормального цикла фотопревращений Бр, обнаруженному при низких температурах.

Кинетика нарастания и релаксации электроиндуцированных спектральных изменений носит двухкомпонентный характер — начальные быстрые фазы сменяются медленными изменениями в секундном диапазоне, которые указывают на структурные перестройки белковой части Бр. Образованный в темноте под действием поля батопродукт, так же как и нормальная «фотоиндуцированная» батопформа, стабильная при низкой температуре, могут быть возвращены в исходное состояние красным светом ($\lambda > 630$ нм), однако в присутствии поля. Вместе с тем в отличие от фотоиндуцированной батопформы электроиндуцированный батопродукт не дает начало циклу дальнейших темновых превращений Бр. Возможно, что электрическое поле изменяет распределение электронной плотности в молекуле Бр аналогично

тому, как это происходит при световой активации, что и проявляется в длинноволновом сдвиге полосы поглощения.

Существование медленных компонентов в кинетике электроиндуцированных сигналов свидетельствует об одновременном протекании процессов диэлектрической поляризации, в которые вовлекаются относительно малоподвижные элементы структуры макромолекулярного комплекса Бр. Электроиндуцированный батохромный сдвиг в Бр существенно ингибируется при понижении температуры уже до -20°C . Это и означает, что внешнее электрическое поле действует на ретиналь, главным образом возбуждая в описне конформационные перестройки, формирующие эффективное реакционное поле в микроокружении ретиналя. Однако одного лишь электрического поля оказывается недостаточно для того, чтобы запустить цикл дальнейших превращений Бр. Тем не менее вполне возможно осуществление регуляторной роли полей такой напряженности, влияющих на реорганизацию компонентов Бр и тем самым на эффективность фотопревращения Бр.

Действительно, эксперименты по импульсному фотовозбуждению пленки ПМ в присутствии внешнего электрического поля показывают, что количество молекул Бр, вовлеченных в этих условиях в цикл фотопревращений, уменьшается примерно на 30%. Таким образом, если в нормальных условиях в клетке произойдет повышение трансмембранной разности потенциалов до определенной величины, то это приведет к снижению коли-

чества молекул Бр вовлекающихся в фотоцикл. В результате создается препятствие для дальнейшего увеличения фотоиндуцированного потенциала на мембране, что может быть важно с точки зрения сохранения ее целостности.

Внешнее электрическое поле способно осуществлять регуляцию фотоиндуцированных процессов в пленке ПМ не только на начальных стадиях

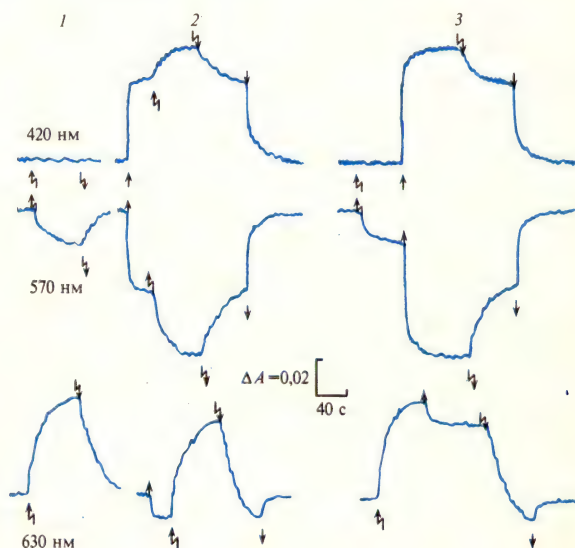


Рис. XXIX.7. Кинетика электро- и фотоиндуцированных изменений поглощения Бр при 420, 570 и 630 нм в воздушно-сухих пленках ПМ

Зигзагообразными стрелками отмечено включение (вверх) и выключение (вниз) электрического поля ($2 \times 10^7 \text{ В} \cdot \text{м}^{-1}$), прямыми стрелками — включение и выключение постоянного действующего света ($380 \text{ нм} < \lambda < 580 \text{ нм}$; $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$); 1—темновые изменения под влиянием поля, 2—электроиндуцированные изменения на фоне действующего света, 3—фотоиндуцированные изменения на фоне приложенного поля

фотоцикла. Важным проявлением такой регуляции является электростимуляция образования ключевого промежуточного продукта фотоцикла Бр — формы M_{412} .

В темноте электрическое поле не вызывает изменений в полосе поглощения M_{412} . Однако включение электрического поля на фоне сине-зеленого света, вызывающего переход $\text{Br}_{570} \rightarrow M_{412}$, приводит к существенному увеличению стационарной концентрации формы M_{412} (рис. XXIX.7). Проявление эффекта электростимуляции не зависит от последовательности включения света и поля.

Приложение электрического поля не вызывает изменения кинетики фотоиндуцированного образования формы M , однако наблюдается заметное торможение распада этой формы, ведущего к регенерации исходного Бр. Этим, видимо, и определяется сдвиг равновесия в сторону накопления промежуточного продукта на свету в присутствии поля.

Следует отметить, что электроиндуцированные изменения поглощения Бр в темноте (при 630 нм) и на свету (при 420 нм; рис. XXIX.7) характеризуются практически одной и той же кинетикой нарастания и спада сигнала с медленными компонентами в секундном диапазоне.

Таким образом, следует предположить существование молекулярного механизма регуляции фотопревращений Бр, который зависит от электрического поля и действует по принципу отрицательной обратной связи. На стадии K_{630} регуляция осуществляется посредством управления фондом потенциально активных макромолекул Бр. Далее на этапе образования M_{412} регу-

лируется скорость превращений тех молекул Бр, которые уже вовлечены в фотоцикл. В физиологических условиях такой механизм может поддерживать протонный градиент в ПМ на уровне, соответствующем энергетическим потребностям клетки. Это обеспечивается за счет уменьшения скорости превращения Бр на завершающей стадии (переход формы М в исходное состояние) в случае нежелательного возрастания напряженности мембранного электрического поля, не компенсированного другими факторами.

Торможение перехода $M \rightarrow B_r$ в электрическом поле следует, вероятно, связывать с уменьшением эффективности (увеличение энергии активации) взаимодействия депротонированного шиффового основания с протон-донорными группами аминокислотных остатков, формирующих протонный канал в макромолекуле Бр. Это может быть вызвано индуцированными поляризационными изменениями ближайшего белкового окружения ретиналя, которые влияют на характер внутримолекулярной подвижности Бр и приводят к локальным структурным перестройкам в этом ПБК.

Диэлектрическая поляризация и конформационные перегруппировки в местоположении ретиналя проявляются в возникновении электрического потенциала между поверхностями пленки ПМ при ее освещении.

На искусственных лецитиновых мембранах, содержащих ориентированные ПМ, при возбуждении коротким лазерным импульсом (10 нс) зарегистрирован фотопотенциал значением около 100 мВ (В. П. Скулачев). Первая быстрая фаза нарастания потенциала ($\tau < 200$ нс) отрицательна по знаку и обусловлена изменением дипольного момента возбужденного ретиналя. Остальные стадии с временами от десятков микросекунд и больше положительны по знаку и отражают уже процесс транслокации протона через мембрану.

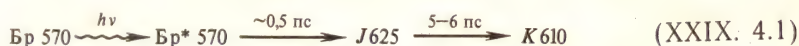
На сухих пленках ПМ, обладающих высокой степенью ориентации мембран, получены фотопотенциалы до нескольких вольт. Кинетика медленных стадий генерации и разрядки фотопотенциала и кинетика образования и распада промежуточной формы М фотоцикла Бр имеют близкий характер. Этот результат подтверждает представление о том, что прохождение стадии М в фотоцикле Бр, контролируемое электрическим полем, отражает конформационные поляризационные перестройки макромолекулярного ПБК в процессе его фотопревращений.

§ 4. Первичный акт фотопревращений бактериородопсина

Природа начальных фотофизических этапов превращения Бр связана со стадией образования первого относительно стабильного промежуточного продукта, который по своим спектральным свойствам идентичен форме K_{610} (батотформа Бр). Превращение $B_{570} \rightarrow K_{610}$ — единственный процесс во всем фотоцикле, где происходит непосредственное поглощение энергии света. Дальнейшая цепь превращений в цикле Бр, включая транслокацию протона, протекает самопроизвольно и уже не требует притока световой энергии. Очевидно, что в фотоцикле Бр первичный акт $B_{570} \rightarrow K_{610}$ «запускает» и всю систему дальнейших последовательных превращений аналогично тому, как это наблюдается в первичных реакциях фотосинтеза, где начальная стадия разделения зарядов в РЦ дает «толчок» всей цепи переноса электрона. Этот принцип носит общий характер.

Природа первичного акта фотоцикла Бр. Методами импульсной лазерной спектроскопии высокого временного разрешения удалось расшифровать кинетику образования формы K_{610} . Возбуждение Бр в ПМ пикосекундными

лазерными импульсами приводит к увеличению поглощения в красной области с максимумом около 610 нм. Время нарастания этих изменений, соответствующее времени образования формы K_{610} , составляет $\sim 5 \div 6$ пс. Однако в тех же условиях обнаружено увеличение поглощения в области ~ 625 нм с временами нарастания $\sim 0,5$ пс и релаксации $\sim 5-6$ пс. Сопоставление этих данных показывает, что появлению формы K_{610} предшествует образование промежуточного продукта с максимумом поглощения при 625 нм и временем жизни, совпадающим с временем нарастания поглощения при 610 нм. Общая схема первичных превращений Br_{570} имеет вид



где Br^*_{570} соответствует возбужденному синглетному уровню, который может быть общим для Br_{570} , промежуточного продукта J_{625} и батоформы K_{610} (см. ниже). Время перехода $J_{625} \rightarrow K_{610}$, равное 5 пс при комнатной температуре (295 К), возрастает в 2—3 раза при 77 К, что соответствует энергии активации 0,58 кДж/моль. Дальнейшее понижение температуры до 1,8 К уже не влияет на время реакции, что указывает на безактивационный путь образования K_{610} в этих условиях. Как было показано (см. гл. XIV), такого рода двухфазный характер температурной зависимости свидетельствует о туннельном переносе электрона, сопряженном с внутримолекулярными конформационными переходами. Однако фотоцикл Br не включает каких-либо окислительно-восстановительных реакций, где бы происходил полный отрыв и перенос электрона между разными молекулами. Под действием поглощенного кванта света в Br лишь смещается электронная плотность вдоль полиеновой цепи при возбуждении ароматического кольца ретиналя. В свою очередь, это смещение сопряжено с определенными изменениями по внутримолекулярным конформационно-колебательным степеням свободы, что и составляет причину наблюдаемой температурной зависимости первичного акта фотоцикла аналогично роли колебательной акцептирующей моды и мягких мод в туннельном переносе электрона.

Основной вопрос заключается в том, какова природа внутримолекулярных перегруппировок в Br , индуцированных в результате возбуждения ретиналя. Существует по крайней мере два возможных пути перестройки молекулы Br , сопровождающей образование K_{610} . 1. Можно предположить, что уже на первой стадии фотоцикла происходит его сопряжение со смещением протона шиффового основания. 2. Во время первичного акта может происходить изомеризация ретиналя и переход его из полностью транс- в 13-цис-конфигурацию (эти две возможности перестройки молекулы Br не исключают друг друга).

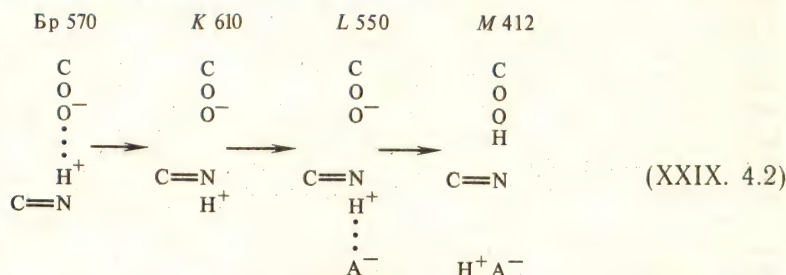
Смещение протона. До конца остается неясным вопрос, на каком из ранних этапов в первичном акте фотоцикла происходит вовлечение протона. В первых опытах по изотопному замещению H_2O на D_2O в Br_{570} показано, что дейтерирование не влияет на амплитуду индуцированного лазерными вспышками образования K_{610} при комнатной температуре. Однако время образования K_{610} при дейтерировании увеличивается от ~ 11 до 18 пс (при комнатной температуре) и от 36 до 88 пс (при 4 К). Эти данные свидетельствуют об участии протона в первичном акте образования формы K_{610} .

Этому выводу противоречат недавние опыты с возбуждением более короткими лазерными импульсами низкой интенсивности, в которых указанный изотопный эффект не был обнаружен.

Методы резонансной раман- и инфракрасной дифференциальной спектроскопии позволяют наблюдать колебания атомов в отдельных химических

связях и определять частоты этих колебаний. Оказалось, что переход $\text{Br}_{570} \rightarrow K_{610}$ сопровождается уменьшением частоты (1640 см^{-1}) колебаний связи $\text{C}=\text{N}$ в протонированном шиффовом основании $\text{C}=\text{N}^+\text{H}$ на $15\text{--}30 \text{ см}^{-1}$. Это свидетельствует об увеличении расстояния между группой COO^- белка и протоном в шиффовом основании, в результате которого происходит делокализация положительного заряда протона с уменьшением частоты колебаний связи $\text{C}=\text{N}$. Происходящее при образовании K_{610} некоторое удаление протона шиффового основания может быть первым этапом на пути его дальнейшей транслокации. Вслед за этим должно произойти взаимодействие протона со следующим акцептором (А) на пути последовательного его переноса.

Наиболее вероятно, что в форме K_{610} шиффово основание еще частично протонировано, хотя состояние протона уже успевает существенно измениться. Об этом также свидетельствуют изменения полосы колебаний при 1646 см^{-1} связи $\text{C}=\text{N}^+\text{H}$, происходящие в пикосекундном временном диапазоне. Смещение протона в шиффовом основании с переходом на следующий акцептор (А) можно представить в виде схемы



В форме M_{412} группа COO^- белка уже протонирована (пик при 1760 см^{-1}) и может служить донором H^+ для депротонированного шиффова основания на последней стадии обращения фотоцикла при переходе $M_{412} \rightarrow \text{Br}_{570}$.

Транс-цис-изомеризация ретиналя. Смещение протона не является единственным типом молекулярных перестроек на первичной стадии фотоцикла. Еще большее значение имеет транс-цис-изомеризация ретиналя. С помощью метода рамановской спектроскопии при низкой температуре, а также динамической спектроскопии в наносекундном и пикосекундном временном диапазонах показано, что уже на стадии существования K_{610} хромофор обладает характеристиками, свидетельствующими о наличии в нем 13-цис-конформации (область $1100\text{--}1400 \text{ см}^{-1}$ в раман-спектре). Существенно, что изменения конфигурации ретиналя при переходе транс- \rightarrow 13-цис- происходят за время, меньшее 40 пс. Раман-спектр ретиналя в 13-цис-конфигурации в форме K_{610} характеризуется появлением новых линий (при 811 и 957 см^{-1}) по сравнению с модельным 13-цис-ретиналем, что указывает на усиление внеплоскостных колебаний протонов, принадлежащих винильным группам полиеновой цепи. Очевидно, в этих условиях 13-цис-кофигурация хромофора находится в возмущенном состоянии вследствие влияния белкового окружения, вызывающего, по всей видимости, торсионную деформацию («скручивание») полиеновой цепи ретиналя.

Процесс изомеризации ретиналя сопровождается также и изменениями поглощения в области $260\text{--}450 \text{ нм}$. Совокупность этих данных позволяет сделать заключение, что процесс транс-цис-изомеризации ретиналя растянут во времени. Он начинается одновременно или даже несколько раньше образования K_{610} ($\tau \leq 10 \text{ пс}$) и связан с сильным сдвигом плотности заряда к иононовому кольцу в возбужденном ретинале, который начинает переходить в 13-цис-сос-

тояние. На протяжении всего времени жизни интермедиата K_{610} хромофор существует в некоем переходном состоянии, которое, строго говоря, не является ни транс-, ни 13-цис-конфигурацией. Полностью завершается процесс изомеризации к моменту образования формы L_{550} . Заметим, что смещение протона от шиффога основания происходит примерно в том же временном диапазоне или позднее, что и стадия образования K_{610} . Микроокружение ретиналя оказывает влияние на характер процесса изомеризации. Это связано с изменениями конформации белка, которые происходят на протяжении всего фотоцикла начиная со стадии K_{610} . В частности, они включают изменение угла наклона α -спиралей к плоскости мембраны на угол $\sim 2^\circ$ при переходе Бр в состояние M_{412} .

Энергетическая схема первичной стадии фотоцикла. Измерения средней длительности флуоресценции Бр показали, что время жизни возбужденного состояния Br_{570} при комнатной температуре составляет $\leq 1,5 \div 3$ пс. Столь малые времена однозначно свидетельствуют о сильных процессах безызлучательной дезактивации электронно-возбужденного состояния в Br_{570} (см § 4 гл. XXVII). Сопровождающие их внутримолекулярные и электронно-колебательные взаимодействия, проходящие за $\sim 1 \div 2$ пс, переводят Br^* из возбужденного в новое основное состояние, соответствующее уже промежуточному продукту фотоцикла J_{625} и далее за 5—10 пс в K_{610} . Стабилизация системы на этом уровне, более высокоэнергетическом по сравнению с исходным Br_{570} , достигается в результате внутримолекулярных перестроек и поляризации ближайшего окружения ретиналя (рис. XXIX.8). При этом происходит запасание энергии электронного возбуждения в форме K_{610} .

Обратный переход в исходное состояние отсюда уже затруднен, так как он потребовал бы перестройки молекулярных групп в Бр, которая в этом случае уже не обеспечена внешней энергией. Под действием света ($\lambda > 630$ нм) регенерация $K_{610} \rightarrow Br_{570}$ может осуществляться и здесь. По существу, весь каскад превращений Бр происходит вдоль кривой потенциальной энергии основного состояния Br_{570} .

Однако роль света не сводится только к преодолению активационного барьера начальной стадии $Br_{570} \rightarrow K_{610}$. Поглощение света обеспечивает сдвиг электронной плотности в Br_{570} и поляризацию белкового окружения ретиналя. За счет соответствующих внутримолекулярных перестроек на кривой появляются новые минимумы, попадая в которые, система стабилизируется. На стадии K_{610} перестройки включают транс-цис-изомеризацию ретиналя, частичный сдвиг протона шиффога основания и изменения в ближайшем белковом окружении. Постепенное снижение энергетических минимумов вдоль кривой основного состояния и изменение барьера между ними каждый раз приводит к соответствующему увеличению времени жизни промежуточного продукта в фотоцикле Бр. В результате не только достигается общая стабилизация энергии возбуждения, за счет которого протекает весь цикл, но и обеспечиваются функционально направленные конформационные пере-

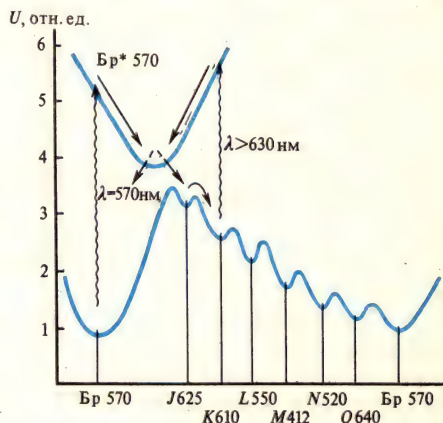


Рис. XXIX.8. Изменения энергии (U) в фотоцикле бактериородопсина

стройки в макромолекулярном комплексе ретиналь-опсин. Такой молекулярный механизм возможен лишь вследствие вполне определенного «устройства» составных частей макромолекулярного комплекса.

Изменение взаимосвязи внутримолекулярных степеней свободы, определяющих релаксацию белка, изомеризацию ретиналя, смещение и перенос протона, может приводить к появлению других фотопродуктов. Так, предполагают, что наблюдаемое при низких температурах преимущественное образование псевдобактериородопсина вместо формы K_{610} происходит, когда этот переход не сопровождается одновременной релаксацией «замороженной» белковой части Бр. Остается неясным, насколько полно в этих условиях может осуществляться изомеризация самого ретиналя, которая и при комнатной температуре проходит быстрее, чем в растворах, вследствие влияния специфического белкового микроокружения (ср. § 6 этой главы).

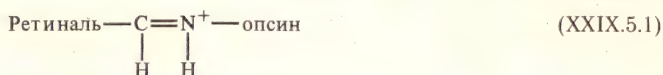
§ 5. Структура и функции зрительного пигмента родопсина

Фоторецепторная мембрана. Способность рецепторных клеток сетчатки глаза реагировать на изменение светового потока лежит в основе зрительного восприятия позвоночных и беспозвоночных животных. Процесс трансформации энергии света в фоторецепторный сигнал у позвоночных происходит в светочувствительных клетках сетчатки — палочках и колбочках. Палочки обеспечивают сумеречное зрение. Наиболее подробно молекулярные и мембранные механизмы зрительной рецепции изучены в палочках позвоночных. Палочка способна генерировать зрительный сигнал в ответ на поглощение одного кванта. При этом в ней возникает вполне измеримый рецепторный электрический потенциал, являющийся нейрофизиологическим выражением зрительного сигнала.

Наружный сегмент палочки состоит из стопки многочисленных дисков, расположенных перпендикулярно длинной оси клетки. Например, палочка лягушки достигает 60 мкм в длину, 6—8 мкм в диаметре, а ее наружный сегмент содержит 1000—1500 дисков. Диск толщиной 15—16 нм образован двумя соединенными по краям мембранами толщиной около 7 нм. Внутреннее расстояние между почти прилегающими друг к другу мембранами не более 1,5—2,0 нм. Основной молекулярной фоточувствительной структурой зрительной клетки является фоторецепторная мембрана.

Родопсин. Фоторецепторная мембрана образована фосфолипидным бислоем, в который встроены молекулы зрительного пигмента родопсина. Вследствие крайне низкой вязкости фоторецепторной мембраны молекула родопсина испытывает в ней быструю вращательную и более медленную латеральную диффузию. Родопсин — хромопротеин с молекулярной массой порядка 40 000. Большой гидрофобный фрагмент молекулы (около 26 000) находится внутри рецепторной мембраны. В этом отношении родопсин напоминает Бр, однако в отличие от последнего он еще содержит меньший гидрофильный фрагмент (12 000) с С-концевым участком в гидрофильной области и на поверхности мембраны. Как и в случае Бр, хромофором родопсина служит ретиналь, представляющий собой половину молекулы β -каротина. Из всех изомеров этой сопряженной полиеновой структуры только 11-цис-форма является хромофором всех известных зрительных пигментов (рис. XXIX.9). В некоторых условиях может образовываться так называемый изородопсин, хромофор которого представляет собой не 11-цис-, а 9-цис-ретиналь. Полипептидная цепь опсина содержит около 400 аминокислот, половина из которых — гидрофобные. Ковалентная связь ретиналя с опсином осуществляется при образовании альдиминной связи между

ε-аминогруппой лизина и альдегидной группой ретиналя. Эта альдиминная связь протонирована и представляет собой протонированное шиффово основание



находящееся в опсине в гидрофобном окружении.

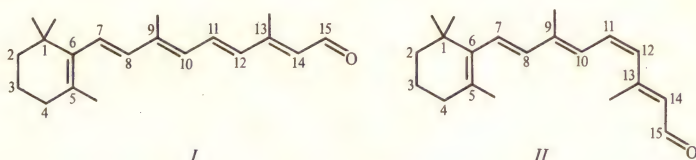


Рис. XXIX.9. Структурные формулы полностью транс-ретиналя (I) и 11-цис-ретиналя (II)

Спектральные свойства родопсина. Эти свойства обусловлены взаимодействием хромофора с опсином. Максимум спектра поглощения изолированного ретиналя лежит около 370—380 нм, а максимум поглощения опсина — 278 нм. Взаимодействие 11-цис-ретиналя с опсином сопровождается батохромным сдвигом его полосы поглощения в зеленую область с образованием основного максимума около 500 нм. Причины такого сдвига до конца не ясны. В изолированных полиеновых структурах, содержащих систему сопряженных двойных связей, с ростом степени делокализации π-электронов наблюдается сдвиг максимума поглощения в красную область. При протонировании шиффова основания и появлении положительного заряда в цепи ретиналя также увеличивается делокализация π-электронов, что, однако, может обеспечить сдвиг максимума спектра поглощения лишь до 440 нм.

Дополнительный сдвиг максимума до 500 нм, характерный для родопсина, видимо, обусловлен электростатическим взаимодействием между ретиналем и белком, которое осуществляется с участием заряженных аминокислотных остатков. Кроме того, стабилизация положительного заряда около атома N шиффова основания может также достигаться и за счет присутствия отрицательно заряженного противоиона (группа белка RCOO^-). Действительно, батохромный сдвиг увеличивается в модельных системах (протонированное шиффово основание *n*-бутиламина) при помещении дополнительного отрицательного заряда вблизи атома C₁₂.

Фотолиз родопсина. Фотопревращения родопсина запускаются в результате поглощения видимого света. При этом происходит обесцвечивание родопсина и сдвиг максимума в спектре поглощения хромофора с 500 нм в коротковолновую область. В то же время положение полосы поглощения при 278 нм, принадлежащей опсину, и ее интенсивность остаются практически неизменными.

В исходном состоянии в родопсине ретиналь находится в 11-цис-, 12-с-цис-конфигурации. В результате фотолиза происходит цис-транс-изомеризация хромофора и депротонирование шиффова основания. Эти процессы сопровождаются изменением взаимодействия ретиналя с опсином и конформации последнего. На конечной стадии разрывается альдиминная связь и высвобождается свободный ретиналь в транс-конфигурации. На рис. XXIX.10 приведена схема фотолиза родопсина, где отмечены максимумы спектров пог-

лошения промежуточных продуктов, температуры, выше которых начинается переход к следующему продукту фотолиза, характерные времена отдельных стадий при комнатной температуре.

Изородопсин, содержащий 9-цис-ретиаль, легко получается в качестве побочного продукта процесса фотолиза: родопсин \rightleftharpoons батородопсин \rightleftharpoons изородопсин, но в рецепторах позвоночных или беспозвоночных он не обнаружен.

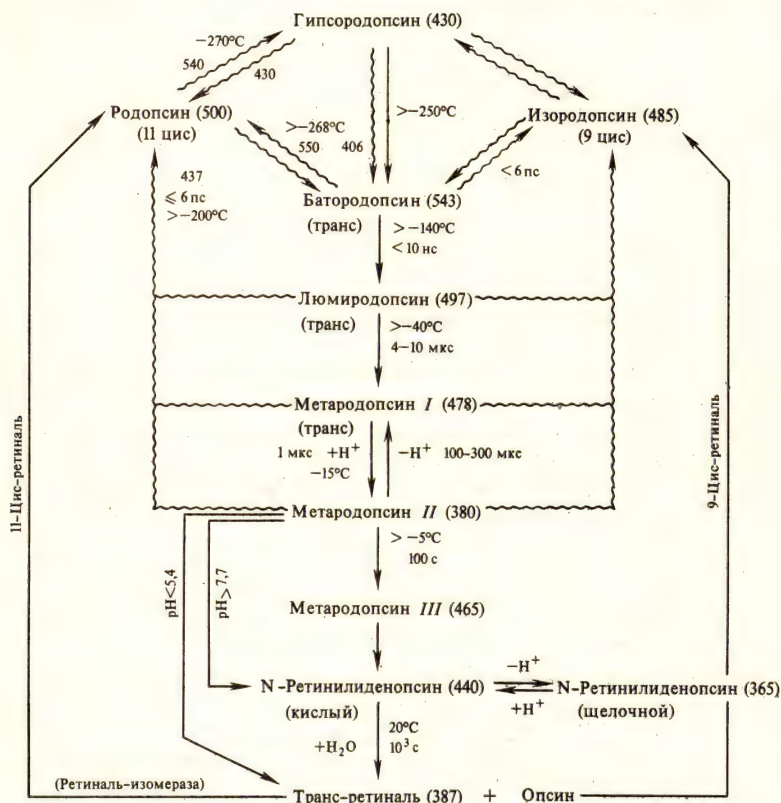


Рис. XXIX.10. Фотолиз родопсина

Волнистыми стрелками обозначены фотореакции, сплошными — темновые переходы; остальные объяснения см. в тексте

Как видно, стадии фотолиза до метародопсина II при комнатной температуре протекают существенно быстрее, чем последующие превращения. Именно быстрые стадии вплоть до метародопсина II относятся непосредственно к фоторецепторному акту — акту трансдукции.

Наибольший физиологический интерес представляет переход метародопсина I (478 нм) в метародопсин II (380 нм). «Синий» сдвиг максимума поглощения метародопсина II до 380 нм означает, что на этой стадии шиффово основание уже полностью депротонировано. На этом же этапе в наружном сегменте происходит и поглощение фоторецепторным диском протона из внешней среды, который, как считают, связывается имидазольной группой гистидинового остатка опсина. На последующих стадиях фотолиза протоны высвобождаются.

Образование метародопсина II сопровождается конформационными изменениями в структуре опсина. Это выражается в том, что фосфолипиды, ранее тесно связанные с опсином, теперь могут быть экстрагированы, а опсин частично фосфорилируется, пептидные и SH-группы белка становятся доступными действию внешних агентов; появляются дополнительно титруемые SH-группы; увеличивается объем, занимаемый липидным окружением опсина. Все это указывает на некоторое разрыхление третичной структуры белка при сохранении его вторичной структуры. Видимо, фотолиз сопровождается перестройками и в самой фоторецепторной мембране вследствие изменения белок-липидных взаимодействий. В частности, увеличивается микровязкость гидрофобного окружения спин-зонда, погруженного в фоторецепторную мембрану.

Огромное количество ненасыщенных жирных кислот в наружном сегменте и высокий уровень потребления кислорода создают опасность фотоокисления липидов (см. гл. XVI) при поглощении света родопсином. Защита осуществляется системой антиоксидантов (α -токоферол), препятствующих развитию процессов перекисного окисления в сетчатке глаза.

Распад образовавшегося в ходе фотолиза метародопсина II может идти либо через образование метародопсина III с его последующей деградацией, либо благодаря прямому гидролизу с появлением конечного продукта — свободного транс-ретинала.

Восстановление родопсина может происходить на свету (фотореактивация) практически из любого промежуточного продукта фотолиза, включая метародопсин II (рис. XXIX.10). Однако физиологическое значение имеет темновая реизомеризация свободного полностью транс-ретинала в 11-цис-конфигурацию и, как следствие, биохимическая регенерация родопсина.

§ 6. Первичный акт фотопревращения родопсина

Цис-транс-фотоизомеризация. Простое сравнение химических конфигураций родопсина (11-цис) и изородопсина (9-цис) показывает, что их взаимопревращение через единственный общий интермедиат батородопсин возможно, если этот процесс включает цис-транс-фотоизомеризацию. Иными словами, в батородопсине ретиналь должен находиться в транс-конфигурации, что подтверждено в настоящее время большим количеством работ. Если исходить из 11-цис-, 12-s-цис-исходной формы ретинала, то начальная стадия фотолиза родопсина включает следующие изменения конформации ретинала:

11-цис, 12-s-цис \rightarrow 11-транс, 12-s-цис \rightarrow 11-транс, 12-s-транс. Возможно, что именно 12-s-цис-связь ретинала в батоформе пигмента дает основной вклад в сильный сдвиг максимумов их спектров поглощения в красную область.

В последние годы цис-транс-изомеризация на стадии образования батородопсина была подтверждена структурными исследованиями, а также данными по круговому дихроизму, резонансной раман-спектроскопии. Так исследованы фотохимические реакции синтетических аналогов родопсина, где атомы углерода C_{10} и C_{13} в полиеновой цепи 11-цис-ретинала были соединены трехуглеродным алкильным мостиком. Такая модификация не мешала изменениям электронной плотности или смещениям протона в ретинале, но предотвращала возможность цис-транс-фотоизомеризации около двойной связи $C_{11}=C_{12}$. Фотопревращения этого химически модифицированного родопсина носили уже совсем другой характер по сравнению с нативным родопсином. Продукты фотохимических реакций резко отличались по

своим свойствам от батородопсина. Они не содержали транс-изомер ретиналя, но образовывались также в пикосекундном временном диапазоне. Отсюда следует, что изомеризация ретиналя из 11-цис- в полностью транс-форму не только является неотъемлемой характерной чертой первичного акта фотолиза 11-цис-родопсина, но и протекает в пикосекундном временном диапазоне.

Показано также, что при комнатной температуре батородопсин образуется за время порядка 3 пс не только из родопсина (11-цис), но и из изородопсина (9-цис). Это может происходить только если ретиналь батородопсина находится в транс-состоянии, поскольку такая конфигурация является единственной общей для обоих 9-цис- и 11-цис-изомеров. Аналогичный вывод следует и из трансформации метародопсина I, который, находясь в полностью транс-конфигурации, претерпевает фотопревращения в те же самые 11-цис- и 9-цис-изомеры. Однако фотохимическая цис-транс-изомеризация ретиналя в родопсине должна проходить в фоторецепторной мембране за несколько пикосекунд даже при очень низких температурах (4 К). Между тем в модельных системах изомеризация протонированных шиффовых оснований в растворе требует нескольких наносекунд. Для понимания природы механизмов, обеспечивающих быструю фотоизомеризацию ретиналя в фоторецепторной мембране, необходимо рассмотреть другие внутримолекулярные изменения, тесно связанные с первичным актом фотолиза родопсина.

Роль протона. Поглощение света и изменение электронного состояния должно привести к соответствующим молекулярным перестройкам в хромофоре и его ближайшем белковом окружении. Цис-транс-изомеризация ретиналя может быть не единственной из таких фотоиндуцированных перестроек. Эти вопросы изучали методами низкотемпературной спектроскопии, с помощью которых исследовали фотопереход родопсин→батородопсин. Применение абсорбционного флеш-фотолиза с пикосекундным лазерным возбуждением позволило измерить скорость этой реакции в широкой области температур. Оказалось, что при комнатной температуре время образования батородопсина < 6 пс, а при 4 К оно составляет 36 пс. Кривая зависимости константы скорости от температуры носит двухфазный характер и, кроме того, обнаруживает явно выраженный изотопный эффект уменьшения (в 7 раз) скорости реакции при дейтерировании (рис. XXIX.11). В сопоставлении с другими данными эти опыты дали основание считать, что смещение протона, проходящее путем туннелирования, также сопровождается появлением батородопсина. Возможно, его смещение связано с начальным этапом депротонирования шиффова основания, которое заканчивается на стадии метародопсина I.

К сожалению, данные по резонансной раман-спектроскопии не дают однозначного ответа на вопрос о степени изменения протонирования шиффова основания в батородопсине в пикосекундном временном диапазоне. Тем не менее предложенные модели предполагают, что смещение протона происходит между атомом N шиффова основания и донорно-акцепторными группами в белковом окружении ретиналя. Очевидно, смещение протона осуществляется на ранней стадии фотолиза, которая, таким образом, не может быть сведена лишь к обычной цис-транс-изомеризации ретиналя. Действительно, методами резонансной раман-спектроскопии удалось показать, что образование батородопсина сопровождается появлением трех сильных линий при 853, 875 и 921 см^{-1} , которые соответствуют высокочастотным ($\approx 10^{-12}$ с) колебаниям протонов. Замена водорода на дейтерий в батородопсине у атомов углерода C₁₀, C₁₁, C₁₂ вызывает сдвиг этих линий. Данные результаты указывают на появление в батородопсине сильных внеплоскостных колебаний атомов H, связанных с CH₃-группами ретиналя.

Особенностью наблюдаемого эффекта является уменьшение частоты (на 60 см^{-1}) колебаний протона H_{12} около C_{12} и внеплоскостных колебаний протонов H_{11} и H_{12} в батородопсине по сравнению с родопсином, изородопсином и свободным полностью транс-ретином. Предполагают, что наблюдаемый эффект обусловлен сильным электрическим полем в области C_{12} , вызванным

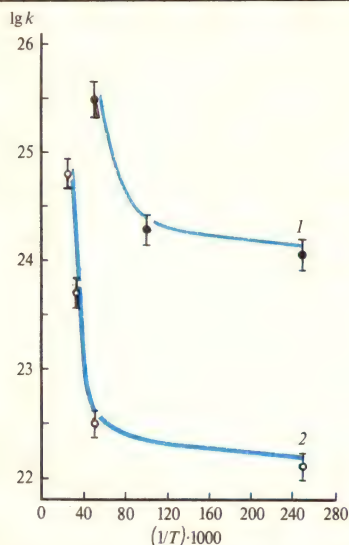


Рис. XXIX.11. Кривые температурной зависимости константы скорости (k) перехода родопсин — батородопсин в аррениусовских координатах:

1 — обычные образцы родопсина, 2 — дейтерированные образцы родопсина

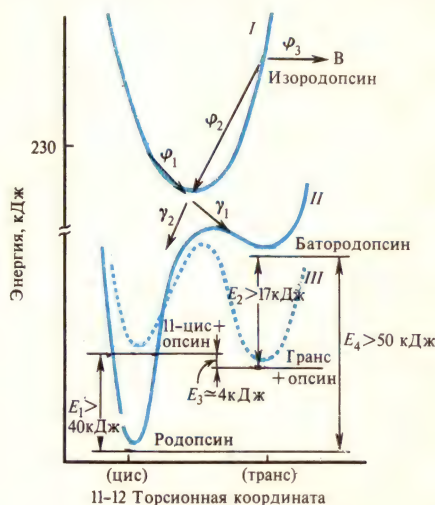


Рис. XXIX.12. Кривые потенциальной энергии основного и возбужденного состояний в родопсине по торсионной координате $\text{C}_{11}-\text{C}_{12}$:

I — возбужденное состояние родопсина и батородопсина, II — основное состояние родопсина и батородопсина, III — основное состояние изолированного хромофора; Φ_1 , Φ_2 — эффективности достижения потенциального минимума родопсином и батородопсином по $\text{C}_{11}-\text{C}_{12}$; γ_1 , γ_2 — эффективности перехода с этого минимума в конфигурации полностью-транс- и 11-цис-основного состояния

отрицательно заряженными группами опсина (COO^-), вблизи которых оказывается протон H_{12} ретиналя. Очевидно, в батородопсине происходит не только образование транс-конфигурации («излом» цепи ретиналя) по двойной связи $\text{C}_{11}=\text{C}_{12}$, но и дополнительное скручивание вокруг одиночной связи $\text{C}_{10}-\text{C}_{11}$ (ср. § 4 этой главы). В результате этого протоны метильных групп $\text{C}_{11}-\text{C}_{14}$ попадают в поле заряженных групп белка, который, таким образом, может влиять на формирование батоформы.

Модели первичной реакции фотолиза. Спектр поглощения ретиналя зависит от степени протонирования шифова основания и присутствия отрицательного заряда белка вблизи полиеновой цепочки. Таким образом, модели первичного акта фотолиза родопсина должны учитывать изменение состояния протонов и активную роль белка в образовании батородопсина.

Исходным положением для построения модели является независимость от температуры и длины волны действующего света квантовых выходов фотопереходов родопсин \rightleftharpoons батородопсин. В соответствии с этим цис-транс-изомери-

зация ретиналя должна происходить в возбужденном (синглетное) состоянии безактивационным путем после полной колебательной релаксации (рис. XXIX.12).

Как видно, кривая возбужденного состояния является общей для родопсина и его батопродукта. Переход в возбужденное состояние сопровождается быстрыми процессами колебательной релаксации, которые, как предполагают,

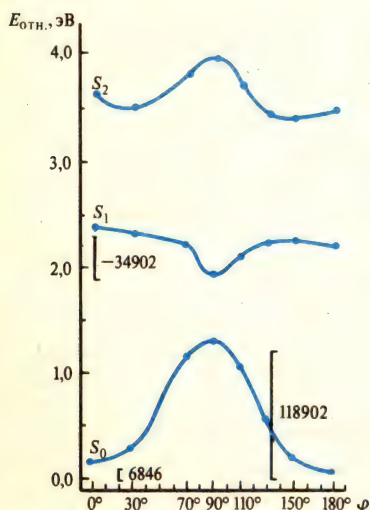


Рис. XXIX.13. Кривые потенциальной энергии для цис-транс-перехода ретиналя в родопсине в зависимости от угла (φ) торсионного вращения вокруг связи 11—12: S_0 , S_1 , S_2 —основное, нижнее и верхнее возбужденное состояния ретиналя;

цифры у кривых обозначена энергия, Дж/моль

протекают с участием высокочастотных ($\sim 10^{13}$ с $^{-1}$) внеплоскостных колебаний H_2 с включением также смещений атомов C. Затем происходит несколько более медленная ($\sim 10^{-12}$ с) релаксация по торсионной степени свободы с переходом из цис- в транс-конфигурацию. Согласно экспериментальным данным, соотношение квантовых выходов перехода из возбужденного состояния в исходную форму и батопродукт составляет 0,33:0,67.

Основной особенностью предлагаемой схемы является наличие общего минимума на потенциальной кривой возбужденного состояния по торсионной координате $C_{11}-C_{12}$, откуда и совершается безактивационный релаксационный переход на основной уровень батоформы или исходного родопсина. Эти выводы подтверждаются результатами квантово-химических расчетов, выполненных методом молекулярных орбиталей (см. § 1 гл. XII). При этом учитывали ковалентное смещение орбиталей основного (S_0), нижнего (S_1) и следующего за ним возбужденных (S_2) синглетных $\pi\pi^*$ -уровней ретиналя. Расчеты подтвердили существование безбарьерной потенциальной кривой нижнего синглетного возбужденного уровня для цис-транс-изомеризации хромофора с протонированным шиффовым основанием (рис. XXIX.13). Небольшой минимум на этой кривой расположен при угле торсионного вращения $\varphi_{11,12} \approx 90^\circ$. Попадая в эту неболь-

шую по глубине (≈ 23 кДж/моль) потенциальную яму, возбужденный родопсин задерживается в ней на $\sim 0,5$ пс. Из этого состояния активированного комплекса (см. гл. XIV) возможен переход в батоформу. Время стабилизации на основном уровне батоформы после полной колебательной релаксации составляет ~ 2 пс. Рассчитанные теоретически значения квантового выхода (0,57) и времени (~ 2 пс) этого перехода хорошо согласуются с экспериментальными данными.

Из рис. XXIX.12 видно, что свободная энергия ($\Delta F = \Delta U - T\Delta S$) батородопсина больше (на ~ 55 кДж) энергии исходного родопсина. Поскольку цис-транс-изомеризация при 77 К не сопровождается большими изменениями энтропии, эта разница отражает непосредственное запасание энергии света за счет повышения внутренней энергии в конформации батородопсина. Свободный ретиналь не обладает способностью запастись энергией при цис-транс-переходе (см. рис. XXIX.12, III). Поэтому этот эффект обусловлен особым микроокружением ретиналя в белке и, в частности, его электростатическими воздействиями с противоионом. Например, увеличение внутренней энергии

и напряженности конформации произойдет, если в результате поворота ретиналя при цис-транс-переходе протонированный атом азота (^+NH) закрепится в новом положении, при котором увеличится расстояние между ним и противоионом белка (COO^-).

Безбарьерный характер кривой общего возбужденного состояния родопсина и батородопсина (рис. XXIX.13) является следствием специфического белкового окружения ретиналя и обеспечивает его быструю изомеризацию. В растворах, где полярные молекулы растворителя создают плотную сольватную оболочку, изомеризация затруднена вследствие причин стерического характера. При учете свободной энергии сольватации в растворе изменяется потенциальная кривая, так что на ней уже появляется барьер, затрудняющий цис-транс-переход в возбужденном состоянии. В этом состоит причина того, что в родопсине время фотоизомеризации (6 пс) намного меньше, чем в растворах ($\sim 1 \div 5$ нс).

§ 7. Проблема внутриклеточного «посредника» в механизме фоторецепции

Рецепторным ответом зрительной клетки является электрический потенциал, возникающий на ее плазматической мембране и декрементно распространяющийся до пресинаптического окончания. Ответ фоторецептора позвоночных (палочки и колбочки) представляет собой гиперполяризацию плазматической мембраны, возникающую вследствие уменьшения Na^+ -проводимости последней. Считают, что других ионных каналов, участвующих в изменении потенциала на этой мембране, кроме светочувствительных натриевых, нет. Сопrotивление мембраны в условиях полностью заблокированных светочувствительных каналов достигает 1 МОм/см^2 , т. е. на 2—3 порядка выше сопротивления обычных клеточных мембран в покое.

Так как эти мембраны образуются в результате инвагинации и отшнуровывания плазматической мембраны в базальной части наружного сегмента палочки, то, казалось бы, их структура, химический состав и электрические свойства должны быть одинаковыми. Однако проводимость фоторецепторной мембраны почти на три порядка выше по сравнению с плазматической в ее темновом состоянии и соответствует по величине сопротивлению мембраны в условиях, когда в ней полностью заблокированы светочувствительные Na^+ -каналы. Предполагают, что в ходе морфогенеза диска либо фоторецепторная мембрана теряет начальные структуры, либо в плазматической мембране они формируются уже после отшнуровывания дисков.

Электрическая реакция фоторецепторной клетки на один поглощенный молекулой родопсина квант складывается из большого числа элементарных актов — актов блокирования отдельных Na^+ -каналов. По оценкам, каждый поглощенный квант света вызывает блокирование в плазматической мембране 100—300 Na^+ -каналов; время открывания каждого канала 200—300 мс, увеличение его проводимости в открытом состоянии около 0,6 пс.

Таким образом, процесс фототрансдукции включает последовательность событий, которые происходят в наружном сегменте фоторецептора, запускаются фотоизомеризацией 11-цис-ретиналя и фотолизом родопсина и появлением большого числа (более 100) молекул внутриклеточного медиатора в цитоплазме наружного сегмента. Завершаются эти события блокированием изнутри Na^+ -каналов плазматической мембраны. Иными словами, связь между фотолизом родопсина и возникновением рецепторного потенциала (сигнала) осуществляется в зрительной клетке как позвоночных, так и беспозвоночных живот-

ных с помощью одного или нескольких внутриклеточных посредников (медиаторы).

В начале 70-х годов роль посредников была отведена Ca^{2+} и циклическим нуклеотидам. Согласно «кальциевой гипотезе», в ответ на действие света ионы Са выбрасываются изнутри фоторецепторных дисков в цитоплазму наружного сегмента, диффундируют к плазматической мембране и блокируют в ней Na^{+} -каналы. В темноте же Ca^{2+} активно «закачивается» из цитоплазмы снова внутрь дисков. По другой гипотезе, циклический нуклеотид цГМФ в темноте поддерживает Na^{+} -каналы в открытом состоянии (в темноадаптированном рецепторе его концентрация в цитоплазме наружного сегмента весьма велика). При освещении концентрация цГМФ в клетке падает, вследствие чего происходит блокирование Na^{+} -каналов в плазматической мембране. В наружном сегменте палочки существует сложная ферментативная система, связывающая фотолиз молекулы родопсина с гидролизом до 10^5 молекул цГМФ. Ее функционирование включает такую основную последовательность событий: 1) фотоиндуцированный переход родопсина в метародопсин II; 2) взаимодействие метародопсина II в фоторецепторной мембране с примембранным ГТФ-связывающим белком (трансдуцин I), в результате которого от трансдуцина I отщепляется ГДФ и присоединяется ГТФ; 3) трансдукция, при которой ГТФ взаимодействует со следующим примембранным белком — фосфодиэстеразой (ФДЭ), активируя его; 4) активированная ФДЭ с высокой скоростью гидролизует цГМФ. Существование этого каскада ферментативных реакций в наружном сегменте не вызывает сомнения, однако кинетическая характеристика его работы *in vivo* остается невыясненной.

Недавно появились сведения, ставящие под сомнение обе гипотезы о внутриклеточном посреднике в наружном сегменте фоторецептора, по крайней мере в их первоначальном виде. Во-первых, получены данные, свидетельствующие о взаимодействии цГМФ и Ca^{2+} в механизме фоторецепции, во всяком случае, в механизме регуляции световой чувствительности (адаптация). Во-вторых, в опытах *in vitro* не удалось обнаружить скольконибудь существенного фотоиндуцированного выхода Ca^{2+} из фоторецепторных дисков (в ответ на свет выходит не более одного иона Са на 1 молекулу обесцвеченного родопсина). Более того, измерение входящих и выходящих потоков Ca^{2+} через плазматическую мембрану наружного сегмента в изолированной сетчатке показало, что в противоположность предсказаниям «кальциевой гипотезы» свет, видимо, вызывает уменьшение, а не увеличение концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме наружного сегмента. В-третьих, результаты опытов с внутриклеточной инъекцией цГМФ в наружный сегмент палочки указывают на то, что если цГМФ и может быть медиатором в механизме фототрансдукции, то не единственным. Скорее всего, цГМФ включается в систему передачи сигнала с родопсина на Na^{+} -каналы в плазматической мембране. Появились сведения об еще одном возможном медиаторе фототрансдукции — фосфоинозитоле.

Таким образом, вопрос о природе внутриклеточных медиаторов и механизмах фототрансдукции и адаптации в зрительной клетке остается открытым.

§ 8. Сравнительная характеристика первичных фотобиологических процессов

Фотосинтез и фоторецепция обеспечивают основные фотоэнергетические и фотонформационные потребности организма и играют различную биологическую роль. Тем не менее очевидна общность первичных молекулярных меха-

низмов этих фотобиологических процессов, которая состоит в том, что первичный акт использования энергии электронного возбуждения хромофора происходит при непосредственном участии его белкового окружения. Энергия электронного возбуждения тратится при этом на «раскачку» отдельных колебаний в белковой глобуле и создание локального конформационно-напряженного состояния.

Это состояние затем распространяется на всю макромолекулу и в конечном итоге приводит к новому конформационному состоянию белка. Фактически во всех этих случаях речь идет о макромолекулярной «машине», работа которой в биологической мембране запускается поглощенным квантом света. Все возникающие при этом первичные функционально значимые изменения есть результат конформационных превращений в белковой части фоточувствительного хромопротеина. В родопсине и бактериородопсине возбуждение хромофора вызывает поворот вокруг двойной связи ретиналя и смещение положительного заряда от атома N протонированного шиффова основания, что и является пусковым механизмом для каскада последующих темновых конформационных изменений опсина. Фотоиндуцированные изменения конформации белка РЦ в фотосинтезе также играют ключевую роль в запуске последующих фотоэнергетических процессов, в том числе и в возникновении трансмембранной разности потенциалов. Итак, возникновение мембранного потенциала, включающее транслокацию протона, и активация ферментативных реакций являются прямым следствием исходных электронно-конформационных взаимодействий в хромопротеине.

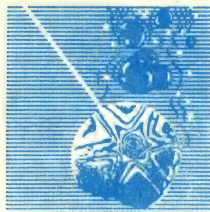
Специфика первичных молекулярных механизмов фотобиологических процессов состоит в наличии фотоиндуцированных конформационных изменений всего хромопротеина в биологической мембране. С этой точки зрения, принципиальное различие между фотоэнергетическими и фотоинформационными процессами заключается в характере работы белковой «машины». В фотосинтезе молекулярная «машина» работает в условиях, когда частота попадания кванта достигает $50\text{--}100\text{ с}^{-1}$. Возвращение в рабочее состояние после завершения цикла обеспечивается (до поглощения следующего кванта) быстрым заполнением положительной «дырки» в фотоактивном пигменте электроном от первичного донора. В бактериородопсине обратимость фотоцикла связана с транслокацией и отщеплением протона и выходом его во внешнюю среду. В фотоинформационном процессе (зрение позвоночных) «машина» (родопсин) срабатывает однократно, после чего она разрушается. При этом белок остается в фоторецепторной мембране, а использованный хромофор (ретиналь в транс-форме) уходит из зрительной клетки. Для регенерации молекулы родопсина требуется доставка уже новой молекулы ретиналя в 11-цис-форме, что происходит за достаточно длительное время (минуты). У беспозвоночных фотогенерация родопсина осуществляется за счет поглощения продуктом его фотолиза кванта света.

В фотоэнергетических процессах необходимость светосбора большого числа квантов для запасаения энергии достигается особой формой организации молекул пигментов в так называемую фотосинтетическую единицу (см. гл. XXVII). Она состоит из нескольких сотен молекул — светосборщиков, которые за счет миграции энергии возбуждения обслуживают один РЦ. В фоторецепторной клетке устройство мембранного аппарата таково, что оно обеспечивает эффективное улавливание даже единичного кванта в системе, содержащей $10^7\text{--}10^{10}$ молекул родопсина. В обоих случаях возбужденные молекулы хромофоров могут вызвать активацию O_2 с переводом его в синглетное возбужденное состояние, дав начало тем самым фотосенсибилизированным процессам деструкции в фотосинтетических и фоторецепторных мембранах.

В фотосинтезе фотосенсибилизатором этого процесса служит все тот же пигмент — светосборщик. В фоторецепторной мембране роль такого сенсибилизатора может выполнять ретиналь, находящийся уже полностью в транс-форме и входящий в состав конечных продуктов фотолиза родопсина. Защита в фотосинтезе от фотодеструкции осуществляется механизмами перехвата энергии возбужденного (триплетное) состояния пигментов каротиноидами до стадии образования синглетного кислорода. В случае фоторецепции защита от повреждающего действия света осуществляется сложной системой, в которой основную роль выполняет естественный антиоксидант — α -токоферол. Его концентрация в зрительной клетке существенно повышена.

Итак, фундаментальные молекулярные механизмы всех первичных фото-биологических процессов включают электронно-конформационные взаимодействия в фоточувствительном хромопротеине. В эволюционном отношении этот механизм был, видимо, первичным и мог возникнуть на ранних этапах эволюции в ходе фотохимических превращений макромолекул. Дальнейшая модификация первичных хромопротеинов в мембранах сделала возможным осуществление процессов, различных по своим биологическим функциям, но единых в отношении первичных молекулярных механизмов. С этой точки зрения, однократного «срабатывания» светочувствительной макромолекулы оказалось достаточно для возникновения фотоинформационного механизма, а запасание солнечной энергии стало возможным уже благодаря многократному повторению циклов работы такого рода светочувствительной макромолекулярной «машины».

Фоторегуляторные и фотодеструктивные процессы



§ 1. Механизмы фоторегуляторных реакций фитохрома

Действие света на растительные и микробные организмы не ограничивается фотосинтезом. Существует большое количество других, прямо не связанных с фотосинтезом фотобиологических процессов, среди которых в первую очередь следует выделить процессы фоторегуляции. В отличие от фотосинтеза они не участвуют непосредственно в запасании энергии квантов света. Однако фоторегуляторные системы выполняют весьма важную функцию, регулируя многие стороны жизнедеятельности организмов.

Особенностью фоторегуляторных систем является их высокая квантовая чувствительность, сочетающаяся с большой эффективностью биологического действия. Это обусловлено триггерным принципом действия систем фоторегуляции: здесь свет служит только сигналом, запускающим сложную цепь последовательных биохимических изменений, приводящих в конечном результате к определенному фотобиологическому эффекту. Триггерный механизм действия света лежит в основе таких известных фоторегуляторных процессов, как фотоморфогенез, фототропизм, фотопериодизм, фототаксис, фотоиндуцированный биосинтез пигментов и ряд других.

Любой фоторегуляторный процесс включает несколько последовательных стадий: поглощение кванта света и образование электронно-возбужденного состояния фоторецептора; фотофизическую реализацию энергии возбуждения и сенсibilизацию фотохимической реакции; образование промежуточных фотопродуктов и конечное проявление фотобиологического эффекта.

Идентификация природы пигментов-сенсibilизаторов — первоочередная задача при изучении механизмов фоторегуляторных реакций. Однако пигменты-сенсibilизаторы большинства фоторегуляторных процессов до сих пор не идентифицированы и о природе их судят только по спектрам действия фотобиологических эффектов. Исключение составляет фитохром — пигмент, характеризующийся универсальностью распространения среди растительных организмов. Именно благодаря открытию этого пигмента в изучении механизмов фоторегуляторных реакций достигнут значительный прогресс. Закономерности функционирования фитохромной системы имеют во многом общий характер с другими фоторегуляторными системами.

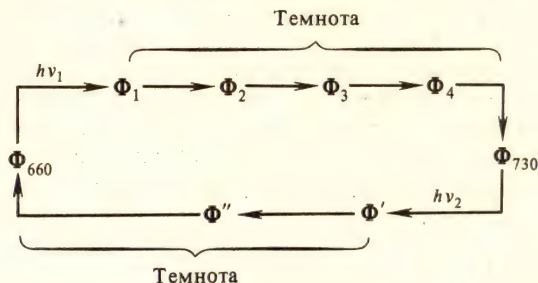
Фитохром — хромопротеин. Его оптические свойства и способность выполнять функцию фоторецептора обусловлены хромофором — линейным тетрапирролом (или билитриеном), который ковалентно связан с белком. Взаимодействие между хромофором и белковой частью пигмента имеет важное значение, поскольку от этого зависит характерное свойство фитохро-

ма — его фотообратимость и наличие двух взаимопревращающихся форм. Одна форма обладает длинноволновым максимумом поглощения при 660 нм (Φ_{660}), а другая — при 730 нм (Φ_{730}). Переход одной формы фитохрома в другую индуцируется красным (660 нм) и дальним красным (730 нм) светом:



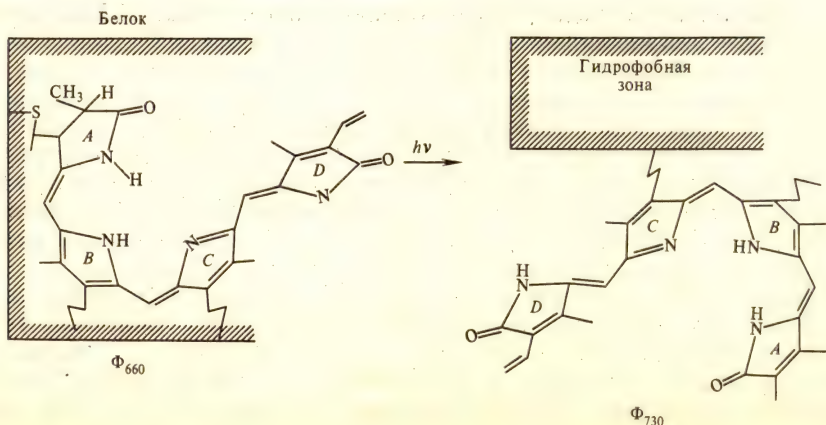
Спектры действия прямой и обратной фотоконверсии фитохрома близко совпадают со спектрами поглощения Φ_{660} и Φ_{730} соответственно. При этом квантовый выход реакции $\Phi_{660} \rightarrow \Phi_{730}$ примерно в 1,5 раза выше, чем реакции $\Phi_{730} \rightarrow \Phi_{660}$.

Как прямая, так и обратная фотоконверсии фитохрома являются многоступенчатыми процессами, т. е. включают в себя образование и распад ряда спектрально различных промежуточных форм, которые зарегистрированы методом флеш-фотолиза при низких температурах. Схематично стадии превращения фитохрома можно изобразить следующим образом:



Из схемы видно, что при фотоконверсиях фитохрома фотохимическими являются лишь первые стадии, тогда как последующие проходят в темноте. Показано, что при прямой фотоконверсии они протекают значительно медленнее, чем при обратной ($\tau_{0,5} = 2,3$ с и $6 \cdot 10^{-3}$ с соответственно).

Первичной фотохимической реакцией фитохрома является цис-транс-изомеризация хромофора, сопровождающаяся конформационными перестройками белка. Предполагают, что при фотоконверсии $\Phi_{660} \rightarrow \Phi_{730}$ наряду с изомеризацией хромофора в нем происходит фототаутомерный перенос протона, приводящий к разрыву одной из его ковалентных связей с белком и образованию в белке гидрофобной зоны:



Конформационные перестройки белка при фотоконверсии фитохрома подтверждаются данными иммунохимического анализа, изменениями в спектрах кругового дихроизма в интервале 200—300 нм и появлением разностных спектров поглощения между формами Φ_{660} и Φ_{730} в области 210—300 нм. Вместе с тем конформационные перестройки белка отличаются от денатурационных, поскольку энтропия активации промежуточных стадий фотоконверсии фитохрома невелика ($\Delta S^* \sim 25$ э. е.).

Физиологически активной формой фитохрома является Φ_{730} . С ее фотоиндуцированным образованием связаны многообразные изменения в метаболизме, активности ферментов, движениях, росте и дифференциации растений. Доказательствами зависимости физиологической реакции от фитохрома могут служить спектр действия этой реакции с максимумом при 660 нм и обратимость эффекта при последовательном чередовании периодов освещения красным и дальним красным светом. Некоторые из фитохром-индуцированных процессов протекают быстро, другие обладают лаг-фазой после фотоконверсии $\Phi_{660} \rightarrow \Phi_{730}$.

Совокупность полученных к настоящему времени экспериментальных данных свидетельствует о том, что «быстрые» процессы обусловлены индуцированными Φ_{730} структурными перестройками мембран. Косвенно на это указывают опыты, в которых при активации фитохромной системы выявлены изменения проницаемости клеточных мембран для ионов, электрического потенциала и адгезивных свойств поверхности растительных клеток. Так, в экспериментах с изолированными корешками проростков фасоли показано, что облучение корней красным светом приводит к развитию положительного биоэлектрического потенциала, тогда как при последующем воздействии дальним красным светом возникает отрицательный биопотенциал. Фотоиндуцированное образование биоэлектрических потенциалов сопровождалось обратимой адгезией корней к отрицательно заряженному стеклу. При этом кинетические характеристики обоих процессов близко совпадали, а сами процессы, как можно видеть на рис. XXX.1, характеризовались достаточно высокой скоростью протекания.

На основании полученных данных сделан вывод о том, что реакции адгезии связаны с фотоиндуцированным изменением проницаемости мембраны и образованием в ней электрохимического градиента в результате изменений ионных потоков в клетках корней. Поскольку оказалось, что этим процессам предшествует изменение в клетках концентрации ацетилхолина, было выдвинуто предположение о медиаторной функции данного гормона. Подтверждением такой точки зрения явились результаты экспериментов, в которых были обнаружены фотомиметические свойства ацетилхолина: экзогенный ацетилхолин заменял действие красного света, усиливая поток H^+ и вызывая реакцию адгезии корней. Представления о роли ацетилхолина в индукции «быстрых» фитохромзависимых реакций отражены на рис. XXX.2.

Индукцируемые фитохромом изменения свойств мембран растительной клетки объясняют, исходя из данных о его ассоциации с определенными участками поверхности мембраны. Таким образом, фитохром можно рассматривать в качестве специфического фоторегуляторного лиганда, а уча-

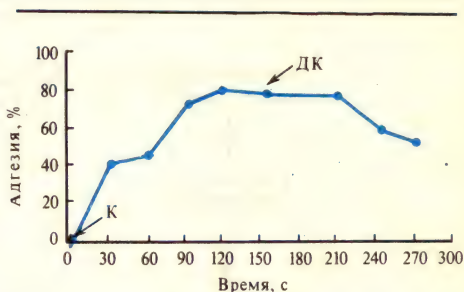


Рис. XXX.1. Кинетика адгезии при действии красного (К) и дальнего красного (ДК) света на корни проростков

сток поверхности мембраны, с которым он связывается,—в качестве ее рецептора. Механизм действия фитохромной системы на мембранном уровне проиллюстрирован на рис. XXX.3.

Наряду с индукцией «быстрых» реакций фитохромная система регулирует большое количество биохимических и физиологических процессов, для реализации которых требуются несколько часов и более длительные промежутки

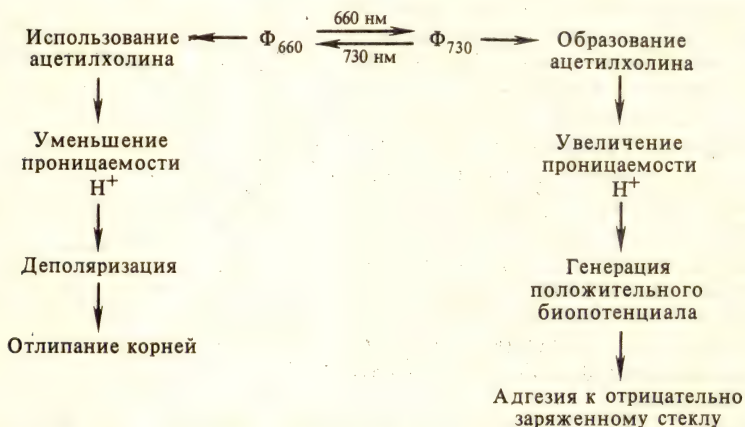


Рис. XXX.2. Участие ацетилхолина в реакции адгезии, индуцируемой фитохромом (Ф)

времени. Установлено, что в основе механизма участия фитохромной системы в этих так называемых «медленных» процессах, лежит индуцированное пигментом Φ_{730} активирование генов. Считают, что каждая дифференцированная клетка содержит полный набор генов, которые по отношению к свету подразделяются по крайней мере на три функциональных типа: активные гены, транскрибирующиеся одинаково в темноте и на свету; неактивные гены, не транскрибирующиеся ни в темноте, ни на свету; «потенциально активные» гены, активирующиеся фитохромом. Форма Φ_{730} через определенные медиаторы гормональной природы включает «потенциально активные» гены, что приводит к синтезу молекул РНК и ферментов, определяющих направленность той или иной морфогенетической реакции.

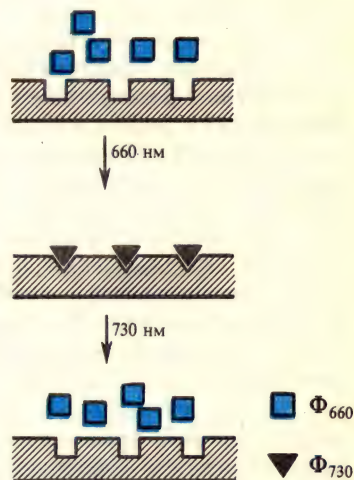
Анализ закономерностей проявления «быстрых» и «медленных» процессов, регулируемых фитохромной системой, позволяет предположить, что на первичных стадиях они реализуются по общему механизму, в основе которого лежат индуцированные Φ_{730} конформационные перестройки мембран. Действительно, изменение проницаемости мембран в результате их конформационных перестроек может облегчить доступ фитогормонов и других важных метаболитов к ДНК и тем самым вызвать дерепрессию генов.

Выше было показано, что первичная фотохимическая реакция фитохрома сопровождается конформационными изменениями белковой части пигмента. Очевидно, именно это свойство фитохрома является определяющим в механизме его регуляторного действия на структурное состояние мембран и активность ферментов. Аналогичным свойством обладает и ряд других фоторецепторных систем, например зрительный пигмент родопсин и светочувствительная система голохром — протохлорфиллид. Последняя участвует в контроле за формированием хлоропластов высших растений и некоторых зеленых водорос-

лей. Поглощение красного света вызывает гидрирование протохлорофиллида, разрушение комплекса голохром — протохлорофиллид, высвобождение белка голохрома с последующим изменением его конформации и кооперативной перестройкой проламеллярной структуры пластиды. Эти реакции сопровождаются индуцированным биосинтезом белка, различных пигментов и компонентов ЭТЦ фотосинтеза.

Рис. XXX.3. Действие фитохрома на мембранном уровне

В темноте рецепторный участок мембраны находится в таком конформационном состоянии (\sqcap), в котором он не может связывать Φ_{660} . Под действием красного света Φ_{660} переходит в Φ_{730} , что сопровождается конформационным изменением белковой части фитохрома, обуславливающим высокое сродство лиганда Φ_{730} к рецепторному участку мембраны. Это, в свою очередь, приводит к переходу рецептора в иное конформационное состояние (\sqcup) и тем самым вызывает изменение конформации и функциональной активности как самой мембраны, так и различных макромолекул, ассоциированных с ней. Последующее облучение дальним красным светом переводит практически весь связанный с мембранной фитохром (Φ_{730}) обратно в форму Φ_{660} , что сопровождается высвобождением фитохрома из мембраны и образованием исходной конформации ее рецепторного участка



§ 2. Другие фоторегуляторные реакции

В настоящее время первичные механизмы действия некоторых фоторецепторов фоторегуляторных реакций подтверждены модельными экспериментами, в которых установлена способность ряда простых органических молекул (фотохромов) при поглощении квантов света эффективно изменять активность ферментов и проницаемость мембран. Видимо, молекула фотохрома образует комплекс с ферментом, что позволяет рассматривать его как фотохром-протеин. Поглощая квант света, молекула фотохрома претерпевает фотохимическую реакцию (например, цис-транс-изомеризации), приводящую к изменению пространственной конфигурации фотохрома, что отражается на характере взаимодействия фотохрома с ферментом. Таким образом, общим свойством фотохромных молекул является их способность изменять активность фермента за счет непосредственного пространственно-структурного взаимодействия с его активным или аллостерическим центром. При встраивании фотохромных молекул в искусственную мембрану удастся наблюдать фотоиндуцированные изменения таких ее свойств, как проницаемость и мембранный потенциал. Существенно меняется и строение мембраны. Так, одна молекула красителя хризофинина, встроенного в искусственную мембрану из полигидроксиэтилметакрилата, при поглощении кванта света индуцирует структурные перестройки, захватывающие несколько сотен молекул мономеров.

В клетках функцию фотохромов могут выполнять различные соединения, каждое из которых характеризуется строго индивидуальным спектром поглощения, поэтому наблюдается большое разнообразие спектров действия фоторегуляторных реакций. Максимумы в спектрах действия фоторегуляторных

процессов, рассмотренных выше, расположены в красной области спектра. Вместе с тем существует ряд процессов, в проявлении которых наибольшей эффективностью обладает свет синей области спектра.

Характерным примером такого рода процессов является фототропизм, определяемый как индуцированное односторонним освещением искривление верхушки надземных частей растений. Фототропические реакции характеризуются исключительно высокой квантовой чувствительностью: заметные изгибы наблюдаются уже при дозах синего света, составляющих $\sim 10^{-3}$ Дж/м². Фототропические изгибы обусловлены различиями в скоростях деления клеток на освещенной и затемненной сторонах растения, что, в свою очередь, связано с фотоиндуцированным созданием бокового градиента гормона роста — ауксина. Спектры действия фототропических реакций позволяют предполагать, что основными рецепторами биологически активного света являются флавиновые хромофоры, способные сенсibilизировать фотоокисление ауксина. Действительно, в модельных опытах обнаружено фотосенсibilизированное рибофлавином окисление молекул ауксина с квантовым выходом $\simeq 0,7$. В то же время показано, что само фоторазрушение ауксинов не может создать необходимый градиент гормона. Предполагают, что такой градиент возникает, в основном, за счет изменения проницаемости мембран при их структурной модификации продуктами фотолиза ауксина. В пользу такой точки зрения косвенно свидетельствуют данные о способности одного из фотопродуктов ауксина (3-метилоксииндол), имитировать фототропный эффект.

В соответствии с описанными данными предложена такая последовательность реакций, приводящих к фототропическому эффекту: поглощение кванта света флавином → фотосенсibilизированное окислительное декарбоксилирование индолилуксусной кислоты → образование 3-метилоксииндола → взаимодействие этого фотопродукта с мембранами → структурная модификация мембран → транспорт ауксинов с появлением бокового градиента → асимметричный рост клеток → изгиб проростка.

В настоящее время накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о том, что фоторегуляторные реакции, индуцируемые светом синей области спектра, свойственны не только фотоавтотрофным организмам, но и гетеротрофам. Например, многообразные реакции фотоморфогенеза характерны как для высших растений, так и для грибов; фототропической чувствительностью наряду с зелеными растениями обладают и многие представители грибов; фотоиндуцированные процессы биосинтеза пигментов, в частности каротиноидов, наблюдаются у растений, грибов и бактерий; индуцируемые светом процессы регуляции роста и метаболизма обнаружены у ряда видов дрожжей и бактерий.

Для большинства отмеченных процессов получены спектры действия света. Однако практически ни для одного из них до сих пор не удалось окончательно идентифицировать пигмент-сенсibilизатор. Остается мало изученной и природа первичных стадий этих фотопроцессов.

§ 3. Особенности фотодеструктивного действия ультрафиолетового света

Фотодеструктивные реакции индуцируются в биологических системах главным образом ультрафиолетовым (УФ) светом. Однако при определенных условиях они могут протекать и при действии света более длинноволновой области спектра. В этом случае повреждение биологически важных макро-

молекул происходит не за счет прямого поглощения ими квантов света, а в результате фотосенсибилизирующего либо фотодинамического действия определенных фотосенсибилизаторов.

Биологически значимое УФ-излучение занимает участок спектра от 230 до 400 нм и подразделяется на три области: коротковолновую УФ (230—290 нм), средневолновую УФ (290—320 нм) и длинноволновую УФ (320—400 нм). При этом экологическим УФ-компонентом солнечного излучения является УФ-свет длин волн больше 290 нм, тогда как коротковолновый УФ из-за эффективного поглощения озоном атмосферы не достигает поверхности Земли.

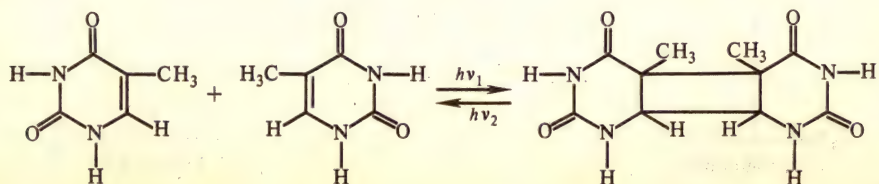
До недавнего времени при изучении механизмов биологического действия УФ-света основное внимание уделяли фотодеструктивным реакциям, которые индуцируются коротковолновым УФ-излучением (254 нм), получаемым от газоразрядных ртутных ламп низкого давления. Такая ситуация в УФ-фотобиологии сложилась прежде всего потому, что уже в первых количественных экспериментах (20—30-е годы) была выявлена наибольшая биологическая активность именно коротковолнового УФ-излучения, которое, как известно, интенсивно поглощается нуклеиновыми кислотами и белками. Что касается более длинноволнового УФ-света, то он весьма слабо поглощается этими макромолекулами, в связи с чем его действие характеризуется на несколько порядков меньшей биологической эффективностью. Естественно, что в дальнейших исследованиях предпочтение отдавали более активному УФ-излучению (короче 290 нм), и к настоящему времени в этом направлении достигнут значительный прогресс.

§ 4. Фотохимические превращения ДНК

Согласно общепринятому мнению, ДНК — основная внутриклеточная мишень при летальном и мутагенном действии коротковолнового УФ-излучения. Это, в частности, подтверждается совпадением максимума в спектрах действия фотобиологических эффектов (260—265 нм) с максимумом в спектре поглощения ДНК.

Основными хромофорами ДНК являются азотистые основания нуклеотидов, причем квантовые выходы фотопревращений пиримидиновых компонентов примерно на порядок выше, чем пуриновых. Поглощение азотистыми основаниями квантов УФ-света (максимум поглощения при 260 нм) приводит к образованию их электронно-возбужденных синглетных и триплетных состояний, которые возникают преимущественно в результате $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов. Электронно-возбужденные состояния пиримидиновых оснований могут вступать в ряд фотохимических реакций, из которых биологически наиболее важны три реакции присоединения: димеризация, гидратация и образование сшивок с белком.

Реакция фотодимеризации. Эта реакция впервые была обнаружена при УФ-облучении замороженных растворов тимина. Она состоит в соединении двух оснований по 5,6-двойной углеродной связи с образованием кольца цикlobутанового типа:



Считают, что димеры пиримидиновых оснований (прежде всего тимина), образующиеся в одной цепи ДНК, составляют 70—80% от всех летальных повреждений, индуцируемых коротковолновым УФ-светом. Характерная черта реакции димеризации — ее фотообратимость. Пиримидиновые основания поглощают свет в области 200—300 нм, их димеры — примерно в том же диапазоне УФ-спектра (200—285 нм). Поэтому при УФ-облучении оснований или ДНК для каждой длины волны возбуждающего света между димерами и основаниями устанавливается динамическое равновесие, определяемое соотношением поперечных сечений димеризации оснований и мономеризации димеров. Так, в случае облучения тимина при 280 нм димеризуется около 65% оснований, а при 280 нм — около 15%.

Вследствие бимолекулярного характера реакции фотодимеризации ее квантовый выход существенно зависит от степени взаимоориентации мономеров при возбуждении одного из них. Например, квантовый выход димеризации тимина в водном растворе при комнатной температуре $\approx 4,7 \cdot 10^{-4}$, а в замороженном растворе ~ 1 . Квантовый выход димеризации тимина в ДНК $\approx 2 \cdot 10^{-2}$. В соответствии с проведенными расчетами условия для димеризации тимина в ДНК являются оптимальными, если соседние мономеры ориентированы друг к другу под углом в 36° .

Вопрос о том, через какое электронно-возбужденное состояние пиримидиновых оснований (первое синглетное или триплетное) осуществляется димеризация, подробно исследовали на растворах тимина и ДНК с использованием тушителей триплетных состояний и метода фотосенсибилизации. Данные об уменьшении выхода циклобутановых димеров при облучении тимина в присутствии триплетных тушителей (кислород и парамагнитные ионы) свидетельствуют о том, что в этом случае димеры тимина возникают через триплетное состояние основания. Однако те же триплетные тушители не оказывают никакого влияния на эффективность образования тиминового димера в ДНК. Поэтому можно было бы считать, что в ДНК димеризация тимина идет через синглетное возбужденное состояние основания. Однако отсутствие влияния триплетных тушителей на выход димеров в ДНК может быть связано и с тем, что константа скорости димеризации на триплетном уровне за счет близкого и благоприятного расположения молекул тимина намного больше константы скорости тушения триплетного состояния. Если такое предположение верно, то димеризация тимина в ДНК возможна и через триплетное состояние. Образование тиминового димера в ДНК через триплетное состояние продемонстрировано в опытах по селективному заселению триплетного уровня с помощью фотосенсибилизатора ацетофенона, у которого синглетный возбужденный и триплетный уровни расположены по отношению к соответствующим уровням тимина в соответствии со схемой



На схеме значения энергий уровней даны в длинах волн квантов соответствующей энергии. При облучении раствора ДНК в ацетофеноне светом длиной волны 350 нм кванты поглощаются только сенсibilизатором. В дальнейшем происходит перенос энергии с триплетного уровня сенсibilизатора (ацетофенон характеризуется весьма высокой степенью интерконверсии) на триплетный (но не синглетный) уровень тимина, который взаимодействует с соседней молекулой тимина с образованием димера цикlobутанового типа.

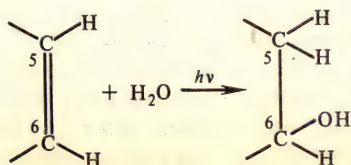
Существует мнение, что димер тимина образуется непосредственно из эксимера, минуя стадию лабильного химического фотопродукта. Как видно из структурной формулы димера, замыкание углеродных связей между двумя молекулами тимина происходит в 5-м и 6-м положениях, между которыми в соответствии с квантово-механическими расчетами в 1-м возбужденном состоянии наиболее высока концентрация неспаренных электронов. Это и способствует «разрыву» 5, 6-двойной связи и замыканию межтиминовых связей.

Некоторые красители акридинового ряда могут эффективно уменьшать выход УФ-индуцированных димеров в ДНК. Защитное свойство акридинов основано на их способности интеркалировать между парами оснований в молекуле ДНК. Характерная черта взаимодействия акридинов (например, акридиновый оранжевый) с ДНК заключается в том, что при образовании комплекса резко увеличивается интенсивность флуоресценции красителя в максимуме спектра при 530 нм. По мнению некоторых авторов, это может быть обусловлено синглет-синглетной миграцией энергии возбуждения с оснований ДНК на краситель. Расчеты показывают, что максимальный квантовый выход такой миграции энергии достигается при соотношении 1 молекула красителя/ ~ 5 оснований и составляет 32%.

Помимо увеличения интенсивности флуоресценции тестом на связывание акридинов с ДНК может служить также изменение степени поляризации люминесценции, зависящей от подвижности молекул красителей. С помощью этого метода показано, в частности, что плоскость кольца акридинового оранжевого перпендикулярна длинной оси спирали ДНК и параллельна плоскостям оснований.

Обсуждают два возможных механизма защитного действия акридиновых красителей. Одни авторы считают, что уменьшение выхода пиримидиновых димеров в присутствии акридинов происходит в результате дезактивации ими возбужденных состояний оснований ДНК. При этом одна молекула красителя за счет синглет-синглетной или триплет-триплетной миграции может принимать энергию от 10—20 оснований. По мнению других авторов, предотвращение формирования димеров происходит за счет изменения структуры молекулы ДНК при интеркарировании красителя, что в силу бимолекулярного характера реакции фотодимеризации приводит к уменьшению ее квантового выхода.

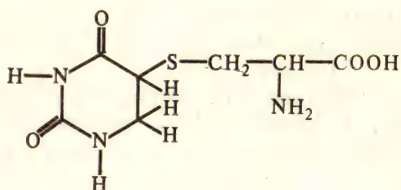
Реакция фотогидратации. Этот процесс — вторая важная фотохимическая реакция пиримидиновых оснований ДНК, которая заключается в присоединении воды к пиримидиновому кольцу у C_5 (H) и C_6 (OH) углеродных атомов с разрывом двойной связи между ними и образованием 6-окси-5-гидропроизводных оснований:



В отличие от димеризации реакция гидратации не является фотообратимой. Однако гидраты могут разрушаться при повышении температуры ($> 30^\circ\text{C}$) и ионной силы раствора, а также при сдвигах pH. Скорость фотогидратации уменьшается при замене H_2O на D_2O . Предшественниками гидратов пиримидинов являются, видимо, их синглетные возбужденные состояния. В пользу этого свидетельствуют следующие данные: триплетные тушители не влияют на фотогидратацию; квантовый выход реакции не зависит от длины волны УФ-света, хотя вероятность конверсии в-триплетное состояние зависит от нее; избирательное фотосенсибилизированное заселение триплетных уровней оснований (например, с помощью ацетофенона) не приводит к их гидратации.

Особенность реакции фотогидратации заключается в том, что она протекает только в одноцепочечной ДНК. Поэтому гидраты пиримидинов могут вносить вклад в летальный или мутагенный эффект лишь у клеток с активными процессами репликации и транскрипции, в ходе которых появляются короткие одноцепочечные участки ДНК.

Сшивки с белками. Это пример межмолекулярных взаимодействий, относящихся к третьему типу фотохимических реакций, в которые вступают пиримидиновые основания ДНК. Акцепторами УФ-света являются оба компонента, поскольку облучение как белка, так и ДНК перед смешиванием сопровождается образованием сшивок. Механизм данного процесса, вероятно, заключается в прикреплении аминокислотных остатков белка через SH- или OH-группы к C_5 или C_6 цитозина или тимина ДНК. В модельной системе наблюдали образование по такому механизму 5-S-цистеин-6-гидроурацила:



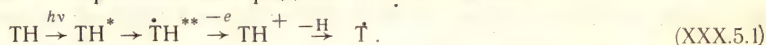
Рассмотренные выше фотохимические реакции ДНК протекают с участием низших возбужденных (синглетное и триплетное) состояний пиримидиновых оснований, которые возникают в результате поглощения одного кванта УФ-света. Вместе с тем при определенных условиях, которые будут описаны ниже, основания ДНК могут вступать в фотохимические реакции и при поглощении двух квантов УФ-света.

§ 5. Двухквантовые реакции

Двухквантовые реакции молекул удается наблюдать либо в «жестких» средах (замороженные до стеклообразного состояния органические растворители) при облучении уже низкоинтенсивным УФ-светом ртутных ламп, либо при импульсном высокоинтенсивном УФ-излучении лазерных источников. В последнем случае двухквантовое возбуждение молекул происходит и в жидких средах при комнатной температуре.

В «жесткой» среде вследствие ограниченности движения молекул время их жизни в 1-м возбужденном триплетном состоянии (T_1) достигает теоретических величин ($\sim 1 \div 10$ с), что обуславливает высокую концентрацию молекул в T_1 -состоянии. Это, в свою очередь, увеличивает вероятность поглощения 2-го кванта света даже при низких интенсивностях УФ-излучения от обычных источников. В результате происходит заселение высшего триплетного уровня

T_n ($T_1 \rightarrow T_n$ = поглощение). В высоковозбужденном триплетном состоянии молекула приобретает способность вступать в такие фотохимические реакции, которые не наблюдаются в условиях одноквантовой фотохимии. Так, при облучении тимина (ТН) в кислых и щелочных стеклах при 225 К происходит его двухквантовая ионизация с образованием радикала \dot{T} по схеме



Гидратированные электроны и радикалы тимина обнаружены методом ЭПР. Особенность такой двухквантовой реакции связана с тем, что молекула после

Рис. XXX.4. Синглетный (I) и триплетный (II) каналы двухступенчатого возбуждения:

S_0 — невозбужденный синглетный уровень, S_1 — первый синглетный возбужденный уровень, S_n — высоколежащий возбужденный синглетный уровень, T_1 — первый возбужденный триплетный уровень, T_n — высоколежащий возбужденный триплетный уровень

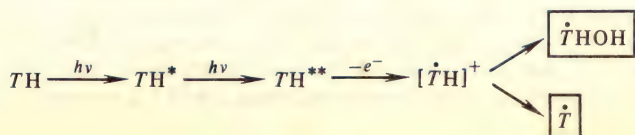


поглощения кванта в нижнем возбужденном T_1 -состоянии переходит в одно из высоковозбужденных состояний, энергия которых превышает энергию ионизации молекулы. Это и обуславливает необычные с точки зрения классической фотохимии химические превращения молекул.

Исследование двухквантовых фотохимических реакций ДНК и ее компонентов в жидкой среде при комнатной температуре стало возможным только после создания импульсных лазерных установок, генерирующих высокоинтенсивное УФ-излучение с длиной волны 266 нм. Установлено, что при облучении водных растворов оснований пикосекундными ($\tau_{\text{имп}} = 30$ пс) или наносекундными ($\tau_{\text{имп}} = 10$ нс) импульсами с интенсивностями выше 10^{10} Вт/м² происходит необратимая деградация молекул. Степень деградации оснований квадратично зависит от интенсивности излучения, что свидетельствует о двухквантовом механизме лазер-индуцированных фотохимических превращений.

Теоретический анализ процессов, происходящих при ступенчатом поглощении молекулой двух квантов света, показал, что при пикосекундных импульсах заселение высоколежащих электронных состояний происходит по синглетному

каналу ($S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_n$), тогда как при наносекундных импульсах — по триплетному ($S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} T_1 \xrightarrow{h\nu} T_n$) (рис. XXX.4). Однако независимо от того, по какому каналу ($S \rightarrow S$ или $T \rightarrow T$) поглощается 2-й квант излучения, в реакциях участвуют, вероятно, фотоионизированные состояния молекул. В пользу такой точки зрения могут свидетельствовать экспериментальные данные о сходе конечных продуктов лазерного фотолиза и продуктов гамма-радиолиза оснований ДНК, при котором процессы идут, как известно, через стадию ионизации молекул. На основе этих данных предложена схема первичных стадий превращений молекулы тимина при лазерном фотолизе:



Возможность фотоионизации оснований при лазерном УФ-облучении можно показать также, оценивая значение энергии, которую приобретает молекула в результате поглощения двух квантов излучения. При поглощении тимином, находящимся в нижнем триплетном состоянии ($E_T = 3,2$ эВ), кванта с длиной волны 266 нм (4,88 эВ) суммарная энергия молекулы (~ 8 эВ) не достигает значения адиабатного потенциала ионизации тимина в газовой фазе ($\sim 8,9$ эВ).

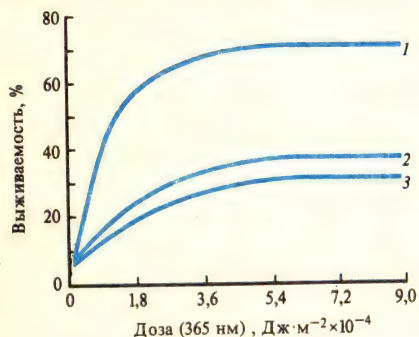


Рис. XXX.5. Зависимость фотореактивации дрожжей, облученных лазерным УФ (266 нм) различной интенсивности, от дозы фотореактивирующего света (365 нм):

1— 10^7 Вт·м⁻², 2— 10^9 Вт·м⁻², 3— $5 \cdot 10^9$ Вт·м⁻²

В конденсированной среде потенциал ионизации уменьшается за счет взаимодействия образующихся ионов со средой:

$$I = I_r - P_+ - V_0,$$

где I_r — потенциал ионизации в газовой фазе, P_+ — энергия поляризации среды катионом, V_0 — энергия взаимодействия «избыточного» электрона со средой (для воды $V_0 = +1,3$). Так как $P_+ > 0$, то потенциал ионизации тимина в водном растворе будет ниже 7,65 эВ. Иными словами, поглощение 2-го кванта действительно может привести к ионизации молекулы.

Лазер-индуцированное двухквантовое возбуждение оснований в составе ДНК приводит к таким ее фотохимическим превращениям, которые не наблюдаются (либо идут с очень низким квантовым выходом) в случае действия низкоинтенсивного УФ-света. Наряду с деградацией оснований в ДНК выявлены разрывы N-гликозидной связи с отрывом тимина от цепи ДНК (при низкоинтенсивном УФ-облучении такой процесс не происходит) и одноцепочечные разрывы. Показано, что квантовый выход одонитевых разрывов при переходе от низкоинтенсивного УФ-облучения (1 Вт/м²) к высокоинтенсивному пикосекундному УФ-облучению ($4 \cdot 10^{13}$ Вт/м²) возрастает от $(1 \div 2) \cdot 10^{-6}$ до $8 \cdot 10^{-5}$.

Вклад двухквантовых фотоповреждений ДНК по сравнению с одноквантовыми (пиримидиновые димеры) в лазерную УФ-инактивацию плазмид, бактериофагов и микроорганизмов значительно выше. Об этом, в частности, свидетельствуют эксперименты по изучению фотореактивации УФ-облученных биологических объектов. Они показали, что с ростом интенсивности лазерного УФ-излучения (266 нм) степень фотореактивации резко уменьшается (рис. XXX.5). Поскольку при фотореактивации ликвидируются летальные фотопродукты только одного типа — цикlobутановые пиримидиновые димеры ДНК, то установленный факт свидетельствует об уменьшении вклада димеров (и соответственно увеличении вклада двухквантовых фотоповреждений ДНК) в лазерную УФ-инактивацию.

§ 6. Фотореактивация и фотозащита

Фотореактивация. Это фотобиологический процесс, направленный на устранение УФ-индуцированных летальных фотопродуктов ДНК. Механизм этого процесса предполагает участие специального фоточувствительного фермента фототиазы, субстратом которого являются только пиримидиновые димеры. Фотореактивация приводит к распаду димеров пиримидина. Кинетические закономерности реакции фотоферментативного расщепления димеров соответствуют кинетике классических ферментативных процессов, описываемых по схеме Михаэлиса — Ментен:



В случае реакции фотомономеризации димеров каталитический акт в фермент-субстратном комплексе протекает только под действием света (320—500 нм): фототиаза работает в электронно-возбужденном состоянии. При этом, видимо, происходит перенос электрона от фермента к субстрату — димеру. Такую точку зрения подтверждают данные об ингибировании процесса ферментативного фоторасщепления димеров активными акцепторами электронов (KNO_3 и KCl), а также результаты модельных экспериментов по фотосенсибилизированному расщеплению димеров в ДНК некоторыми индольными производными, которое, как показано, включает стадию переноса электрона от сенсибилизатора к димеру.

К настоящему времени фермент ответственный за фотореактивацию, выделен из многих биологических объектов, однако его хромофорную группировку удалось идентифицировать пока только у двух фототиаз: бактериальной и дрожжевой. Анализ спектральных свойств этих ферментов позволил отнести их хромофорные группы к соединениям флавиновой природы: у дрожжевой фототиазы это восстановленный ФАД (ФАД_{вос}) с максимумом поглощения при 380 нм, а у бактериальной — производное диазофлавина с максимумом поглощения, зависящим от pH в области от 375 до 420 нм. Представляют интерес данные о том, что флавиновый хромофор в модельной системе обладает способностью к фоторасщеплению пиримидиновых димеров в ДНК, что может свидетельствовать о его роли как кофактора фототиазы.

Фотозащита. Помимо фотоферментативного расщепления димеров ДНК (процесс фотореактивации), уменьшить выход этих фотопродуктов в клетках можно с помощью другого фотобиологического процесса — фотозащиты. Фотозащитный эффект заключается в том, что предварительное облучение клеток длинноволновым УФ-светом приводит к значительному уменьшению их чувствительности к летальному действию коротковолнового УФ-излучения. Недавно такой эффект обнаружен у ряда представителей дрожжевых организмов.

Характерная особенность фотозащитного эффекта заключается в том, что для его проявления необходим температурно-зависимый интервал времени между последовательными воздействиями на клетки длинноволнового и коротковолнового УФ-света. В этот интервал времени в клетках происходит фотоиндуцированное образование определенного соединения, идентифицированного как 5-окситриптамин, или серотонин. Роль данного соединения в качестве основного интермедиата в процессе фотозащиты подтверждается следующими результатами. 1. Фотозащита практически не наблюдается у клеток, дефицитных по предшественникам синтеза серотонина (триптофан и 5-окситриптофан), однако эффект вновь проявляется при их экзогенном введении в клетки. 2. Специфический

ингибитор цепи синтеза серотонина полностью снимает эффект фотозащиты. 3. Экзогенно добавленный к клеткам серотонин вызывает эффект защиты от УФ-инактивации, аналогичный фотозащите, т. е. серотонин обладает фотомиметическим действием.

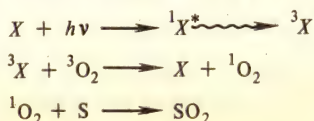
Согласно данным, полученным в опытах *in vivo* и в модельных экспериментах (Г. Я. Фрайкин), защитное действие серотонина в процессе фотозащиты осуществляется в результате его связывания с ДНК и уменьшения выхода в ней УФ-индуцированных пиримидиновых димеров. Спектрофлуориметрический анализ показал, что серотонин связывается с ДНК интеркаляционным путем. При этом каждая интеркалированная молекула серотонина может уменьшать выход димеров в ДНК на участке цепи, включающем ~ 4 пары оснований.

§ 7. Действие длинноволнового ультрафиолетового света

До сих пор рассматривались только те фотохимические реакции ДНК, которые индуцируются коротковолновым УФ-светом. Вместе с тем проведенные в последние годы исследования позволили установить, что фотодеструктивные реакции в ДНК как *in vivo*, так и *in vitro* могут протекать при действии длинноволнового УФ-света (320—400 нм). Однако для того чтобы наблюдать такие реакции, необходимо использовать весьма высокие интенсивности и дозы излучения, на 2—3 порядка (по интенсивности) и 5—6 порядков (по дозе) превышающие значения соответствующих параметров коротковолнового УФ-излучения.

Длинноволновый УФ-свет индуцирует в ДНК образование двух основных фотопродуктов: пиримидиновых димеров и одноцепочечных разрывов. Выход димеров не зависит от того, в каких условиях производят облучение ДНК — аэробных или анаэробных, т. е. процесс образования димеров не является кислородзависимым. В то же время разрывы наблюдаются только при облучении ДНК в присутствии O_2 . Эти данные свидетельствуют о различных механизмах образования двух типов фотопродуктов. С другой стороны, очевидно, что в обоих случаях молекула ДНК не может служить первичным хромофором при действии УФ-излучения длин волн больше 320 нм, поскольку длинноволновая граница ее поглощения лежит при 300—310 нм. Следовательно, и димеры, и разрывы должны образовываться не за счет прямого поглощения квантов молекулой ДНК, а косвенным путем с участием определенных молекул — хромофоров, тесно связанных с ДНК. Это подтверждается данными о более высоком выходе как димеров, так и разрывов при облучении бактериальной ДНК *in vitro*, чем *in vivo*.

Хромофоры для индуцированного длинноволновым УФ-светом образования фотопродуктов в ДНК не идентифицированы. Однако, очевидно, что как сами хромофоры, так и механизмы сенсibilизируемых ими фотохимических реакций, приводящих к образованию димеров и разрывов, должны быть различными. Зависимость от O_2 выхода разрывов позволяет считать, что образование этих фотопродуктов идет по фотодинамическому механизму. Такой механизм, как известно, осуществляется при наличии следующей комбинации факторов: свет + хромофор + O_2 . Первичной стадией фотодинамической реакции является поглощение кванта света хромофором (X) с образованием его триплетного состояния (3X). В дальнейшем при переносе энергии от триплетно-возбужденного хромофора на O_2 образуется синглетный кислород (1O_2), который, взаимодействуя с субстратом (S), вызывает его модификацию.



Считают, что эти реакции идут через свободнорадикальные промежуточные состояния реагирующих молекул. Участие свободных радикалов в индуцированном длинноволновым УФ-светом образовании одноцепочечные разрывы ДНК подтверждают данные о значительном уменьшении выхода этих фотоповреждений при облучении ДНК в присутствии некоторых химических соединений — перехватчиков свободных радикалов.

Отсутствие зависимости от O_2 выхода пиримидиновых димеров при облучении ДНК длинноволновым УФ-светом свидетельствует о том, что их образование осуществляется не по фотодинамическому механизму, а путем молекулярной фотосенсибилизации, при которой энергия возбуждения с молекулы хромофора, поглотившей квант света, переносится на пиримидиновое основание ДНК. (Выше был рассмотрен пример образования димеров по такому механизму, когда в качестве первичного хромофора-сенсибилизатора выступала молекула ацетофенона).

Индукцируемые длинноволновым УФ-светом повреждения ДНК обуславливают инактивирующий, летальный и мутагенный эффекты при действии этого излучения на трансформирующую ДНК, бактериофаги и микроорганизмы. Сильная зависимость фотобиологических эффектов от O_2 , а также отсутствие фотореактивации позволяют считать, что основными летальными фотопродуктами являются одноцепочечные разрывы ДНК, а не пиримидиновые димеры, как это имеет место в случае действия коротковолнового УФ-излучения. Роль разрывов в инактивирующих эффектах длинноволнового УФ-света подтверждается данными о совпадении спектров действия фотоинактивации биологических объектов со спектром действия образования разрывов в ДНК.

Рассмотренный выше материал свидетельствует о том, что фотодеструктивные реакции в ДНК индуцируются не только коротковолновым, но и длинноволновым УФ-излучением. Поскольку большинство биологических систем подвергается действию солнечного света, необходимо детально исследовать молекулярные механизмы биологических эффектов длинноволнового УФ. Это тем более важно, что длинноволновое УФ-излучение является эффективным в индукции эритемы и рака кожи человека и животных, особенно при его комбинированном действии со средневолновым УФ (290—320 нм), приводящем к синергическим эффектам.

Такого рода синергические фотодеструктивные реакции обнаружены также при комбинированном действии различных длин волн УФ-спектра на ДНК, бактериофаги, микроорганизмы и некоторые другие биологические системы. Однако механизмы, лежащие в основе этих реакций, в настоящее время исследованы мало.

§ 8. Действие ультрафиолетового света на белки

Второй внутриклеточной мишенью при действии УФ-излучения на биологические системы являются белки. УФ-свет инактивирует белки по одноквантовому, одноударному механизму с квантовым выходом для разных белков от 10^{-2} до 10^{-3} . Чтобы идентифицировать природу белковых хромофоров, взаимодействие света с которыми приводит к инактивации белков, нужно наряду со спектром действия процесса измерять степень фотоповреждения различных аминокислот при разных длинах волн и дозах УФ-излучения. Использование такого подхода позволяет выявить роль определенных аминокислотных остатков в поддержании нативной структуры белков или ферментов.

Если принять, что из n_i остатков какой-то аминокислоты в белковой молекуле m_i остатков существенны для сохранения ее интактности и «поперечное сечение»

разрушения этих остатков (σ_i) — величина постоянная, то сумма поперечных сечений фотолиза всех остатков данной аминокислоты будет равна

$$\sigma_1 m_1 + \sigma_2 m_2 + \dots + \sigma_n m_n = \sum_i \sigma_i m_i. \quad (\text{XXX.8.1})$$

Так как при УФ-облучении белков фотолизу подвергаются главным образом триптофан и цистин, то выражение для поперечного сечения инактиваций белка (σ_6) можно записать в следующем виде:

$$\sigma_6 = \sigma_{\text{три}} m_{\text{три}} + \sigma_{\text{цис}} m_{\text{цис}}. \quad (\text{XXX.8.2})$$

Величину σ_6 можно определить из дозовой кривой инактивации белка, а значения $\sigma_{\text{три}}$ и $\sigma_{\text{цис}}$ — из дозовых кривых фотолиза триптофанового и цистинового остатков в данном белке. Однако остается невыясненным, какие именно остатки триптофана и цистина являются «существенными» для инактивации белка. Решение этого вопроса возможно при использовании монохроматического облучения белка УФ-светом различных длин волн, которые по-разному поглощаются триптофаном и цистином (например, 254 нм и 280 нм). В данном случае значения σ_6 определяют для обеих длин волн УФ-света:

$$\sigma_6^{254} = \sigma_{\text{три}}^{254} m_{\text{три}} + \sigma_{\text{цис}}^{254} m_{\text{цис}}; \quad (\text{XXX.8.3})$$

$$\sigma_6^{280} = \sigma_{\text{три}}^{280} m_{\text{три}} + \sigma_{\text{цис}}^{280} m_{\text{цис}}. \quad (\text{XXX.8.4})$$

Из этих уравнений можно найти значения двух искоемых величин: $m_{\text{три}}$ и $m_{\text{цис}}$. С помощью этого подхода показано, например, что в трипсине разрушение одного остатка триптофана (из четырех) и одного остатка цистина (из шести) приводит к фотоинактивации фермента. В пепсине существенным для фотоинактивации оказалось разрушение только одного остатка триптофана.

Итак, именно фотолиз триптофана и цистина имеет первостепенное значение в фотоинактивации белков. Учитывая это, рассмотрим механизмы первичных УФ-индуцированных процессов в этих аминокислотах.

В настоящее время доказано, что основной первичной фотореакцией триптофана (АН) в белке является его фотоионизация с образованием катион-радикала и сольватированного электрона:



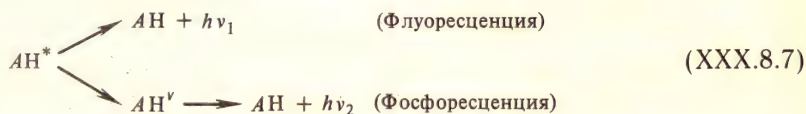
При комнатной температуре эта реакция протекает за 5—20 мкс и может быть исследована только с использованием метода флеш-фотолиза. Показано, что через 5 мкс после УФ-облучения в растворе триптофана появляются характерные максимумы поглощения в красной и дальней красной области спектра, которые принадлежат сольватированному электрону, т. е. электрону, «выбитому» из молекулы аминокислоты и захваченному дипольными молекулами растворителя. Сольватированный электрон быстро реагирует с другими молекулами, в частности, с молекулами растворителя и O_2 , вследствие чего полоса его поглощения исчезает. Однако если облучать замороженные образцы триптофана при температуре жидкого азота (в этих условиях сольватированные электроны не рекомбинируют), то поглощение сольватированного электрона (максимум при 600 нм) можно зарегистрировать и на обычном спектрофотометре. Кроме того, наличие некомпенсированного магнитного момента (спин) у сольватированного электрона позволяет обнаружить его методом ЭПР.

При облучении реакционной смеси из сольватированного электрона и катион-радикала триптофана красным светом, поглощаемым сольватированным элект-

роном, происходит обратная фотохимическая реакция с образованием исходной аминокислоты:



При этом часть молекул аминокислоты оказывается в возбужденном состоянии, о чем свидетельствуют ее УФ-флуоресценция и синяя фосфоресценция (процесс фотоиндуцированной люминесценции):



Рекомбинация сольватированного электрона и катион-радикала триптофана происходит и спонтанно за счет термической активации выхода электрона из ловушки. В результате наблюдается рекомбинационное свечение, активируемое при нагревании (термолюминесценция):



Исследование рассмотренных выше процессов позволило получить данные о механизме образования катион-радикала триптофана $\dot{A}N^+$. Линейная зависимость от интенсивности УФ-света интенсивности термолюминесценции и фотоиндуцированной люминесценции триптофана в замороженных водных растворах свидетельствовала о том, что его фотоионизация в этих условиях осуществляется по одноквантовому механизму, причем предшественником катион-радикала является, вероятно, синглетное возбужденное состояние триптофана. Последнее подтверждается опытом, в котором показано, что увеличение темнового интервала между УФ-облучением замороженного водного раствора триптофана и действием красного света в пределах времени жизни триплетных состояний триптофана (6 мкс) не приводит к возрастанию интенсивности фотоиндуцированной люминесценции, отражающей концентрацию $\dot{A}N^+$. Однако в сильнощелочных замороженных растворах триптофана интенсивность термолюминесценции и поглощение сольватированного электрона при 600 нм квадратично зависят от интенсивности УФ-света, что указывает на возможность фотоионизации молекулы по двухквантовому механизму. В этом случае поглощение 2-го кванта происходит, видимо, на триплетном уровне:



Кроме того, в водно-солевых (NaCl) замороженных растворах триптофана скорость образования $\dot{A}N^+$ нелинейно зависела от интенсивности УФ-света со степенным показателем в пределах от 1 до 2, что указывает как на одноквантовые, так и двухквантовые реакции. Следовательно, при ионизирующем действии УФ-света на замороженные растворы триптофана электрон может отрываться как от синглетно-, так и от триплетно-возбужденной молекулы.

Что касается фотоионизации триптофановых остатков в белке при физиологических условиях, то она осуществляется, вероятно, только по одноквантовому механизму с участием синглетных возбужденных состояний молекул. В пользу этого свидетельствуют, в частности, экспоненциальные зависимости от дозы УФ-света как фотолиза триптофановых остатков, так и фотоинактивации белков. Предполагают, что возникающий в белках под действием УФ-света катион-ра-

дикал триптофана диссоциирует на протон и нейтральный радикал, который, взаимодействуя с соседними группами полипептидной цепи, образует межмолекулярную ковалентную «сшивку» — стабильный фотопродукт:



Если фотолизу подвергается триптофан, входящий в состав активного центра фермента, то этого, очевидно, достаточно, чтобы вызвать потерю его ферментативной активности. В том случае, когда происходит фоторазрушение триптофана вне активного центра, такая сшивка может изменить водородные, гидрофобные и другие слабые связи, поддерживающие нативную конформацию белковой макромолекулы, что также приведет к потере ее ферментативной активности.

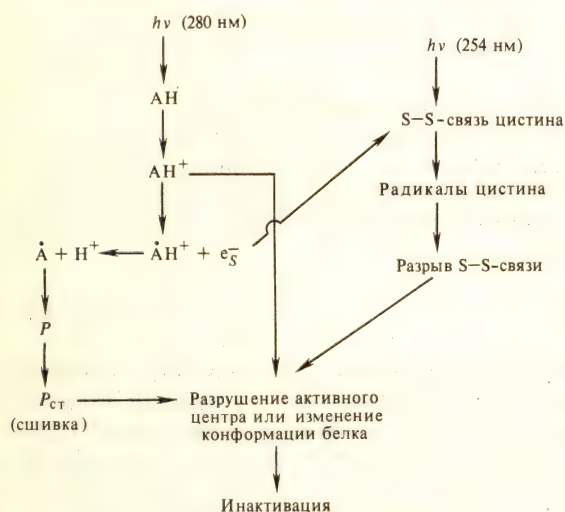
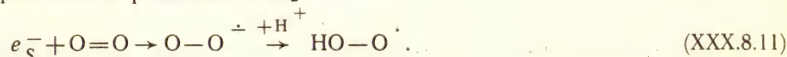


Рис. XXX.6. УФ-инактивация белков:
АН-триптофан

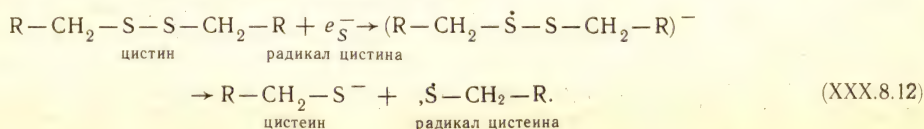
Рассмотренный механизм прямого фотолиза триптофана — не единственная причина повреждающего действия УФ-излучения на белки. Вторым механизмом фотоинактивации белков связан с фотосенсибилизированными реакциями при участии сольватированного электрона. Последний, будучи сильным восстановителем, активно реагирует с различными соединениями, обладающими высоким сродством к электрону, и прежде всего — с растворенным O_2 , обра-

зуя O_2 и гидроперекисный радикал $\text{HO}_2\cdot$:



Однако реакции с участием молекулярного кислорода вносят незначительный вклад в процесс УФ-инактивации белков. Так, фотоинактивация трипсина проходит примерно с одинаковым квантовым выходом в присутствии кислорода (0,026) и в вакуумированных растворах (0,028). Наибольшее значение имеет взаимодействие сольватированного электрона непосредственно с аминокислотными остатками белковой макромолекулы. При этом вероятность такого взаимодействия в зависимости от сродства той или иной аминокислоты к сольватированному электрону может быть различной. Поскольку наибольшим сродством к сольватированному электрону обладает цистин, можно ожидать, что именно эта аминокислота будет в первую очередь разрушаться в результате взаимодействия с сольватированным электроном.

Использование методов флеш-фотолиза и ЭПР позволило изучить механизм взаимодействия сольватированного электрона с цистином, который включает образование свободных радикалов по схеме



Дисульфидные группы белка могут разрушаться не только за счет фотосенсибилизированных реакций, но и вследствие прямого фотолиза. Наиболее эффективной в этом процессе является спектральная область, где максимально поглощает свет цистин, т. е. короче 260 нм. УФ-свет этих длин волн (например, 254 нм) особенно активен в инактивации белков, поскольку квантовый выход фотолиза цистина на порядок превышает таковой для триптофана. В соответствии с приведенными выше данными процесс фотоинактивации белков можно представить в виде общей схемы (рис. XXX.6).

§ 9. Действие ультрафиолетового света на биологические мембраны

Важность биологических мембран в метаболизме клетки позволяет их рассматривать в качестве еще одной внутриклеточной мишени при действии УФ-излучения. УФ-облучение вызывает увеличение проницаемости мембран для различных веществ и прежде всего для ионов. Изменение ионной проницаемости клеточных мембран обнаружено у самых разнообразных биологических объектов — от микроорганизмов до клеток растительных и животных организмов. Увеличение проницаемости мембран для ионов показано также при УФ-облучении безъядерных клеток, например эритроцитов. Следствием этих изменений является нарушение осмотического баланса, приводящее к набуханию и гемолизу эритроцитов. УФ-индуцированное увеличение ионной проницаемости наблюдается и для мембран субклеточных структур, таких, как митохондрии или лизосомы.

Результаты исследования УФ-индуцированных процессов изменения ионной проницаемости мембран животных клеток свидетельствуют о том, что нарушение их барьерной функции связано главным образом с фотолизом липидов. Основной путь фотолиза мембранных липидов заключается в перекисном фотоокислении цепей полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. Результатом такого фотоокисления является образование гидроперекисей и продуктов их дальнейшего превращения. При этом протекают две фотохимические реакции: кислородзависимая цепная реакция перекисного окисления, заканчивающаяся образованием гидроперекисной, и реакция разложения гидроперекисей, при которой накапливаются самые разнообразные продукты, в частности альдегиды и кетоны. Гидроперекиси поглощают при 233 нм и после добавления к ним солей Fe^{2+} дают вспышку хемилюминесценции; продукты 2-й реакции обладают поглощением в области 260—280 нм и характеризуются способностью давать окраску с 2-тиобарбитуровой кислотой — реагентом на диальдегидную группу — $\text{CO} - \text{CO} -$ (ТБК-активные продукты).

Процесс перекисного окисления липидов является фотосенсибилизированным, так как ненасыщенные жирные кислоты, не обладая способностью поглощать свет в средневолновой и длинноволновой области УФ-спектра, подвергаются перекисному фотоокислению при облучении в данной области спектра. Наиболее вероятными фотосенсибилизаторами могут быть продукты собственного окисления липидов (прежде всего гидроперекиси), которые практически всегда присутствуют в мембранах животных клеток и их органелл. Механизм сенсибилизации липидов к УФ-излучению собственными продуктами окисления состоит в фотоинициировании цепей окисления ненасыщенных жирных кислот свободными радикалами, генерируемыми из гидроперекисей (см. § 4 гл XVI).

Важной особенностью перекисного фотоокисления липидов в мембранах животных клеток является ингибирование процесса антиоксидантами (например, α -токоферолом) и зависимость скорости его протекания от структурного

состояния мембран, контролируемого, в частности, температурой. Показано, что возрастание степени перекисного окисления липидов при температурах выше 20—25°C, характерное для мембран микросом, митохондрий и эритроцитов, связано не с изменением конформации белков, а со структурной перестройкой липидной зоны мембраны, поскольку аналогичный эффект наблюдается и на липосомах, сформированных только из липидов.

При изучении влияния температуры на скорость перекисного фотоокисления липидов и УФ-индуцированное изменение ионной проницаемости эритроцитов,

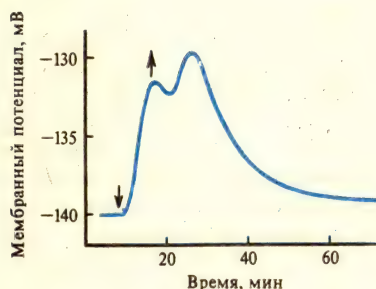


Рис. XXX.7. Мембранный потенциал растительной клетки во время и после УФ-облучения (254 нм; 1400 Дж·м⁻²)
Стрелками обозначено включение и выключение света

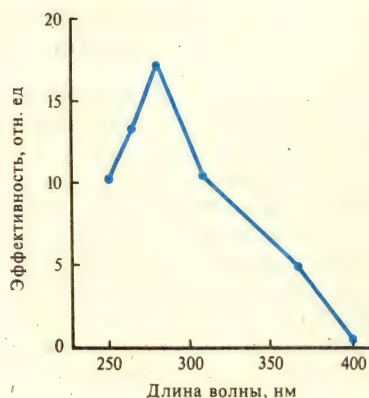


Рис. XXX.8. Спектр действия УФ-инактивации АТФазы плазматической мембраны растительной клетки

определяемой по скорости их гемолиза, выявлена близкая корреляция в зависимости этих процессов от температуры. Такая же закономерность обнаружена и при изучении влияния кислорода и экзогенных антиоксидантов: удаление O₂ прекращает перекисное фотоокисление липидов в мембранах эритроцитов и резко снижает скорость их гемолиза; α-токоферол тормозит перекисное фотоокисление липидов и заметно уменьшает степень гемолиза эритроцитов. Проведенные на основании этих данных оценки показали, что под действием УФ-излучения (254 нм) при дозе 2 · 10⁴ Дж/м² около 90% каналов K⁺- и Na⁺-проницаемости в эритроцитарных мембранах возникает за счет перекисного фотоокисления липидов. Остальная часть каналов образуется, вероятно, в результате фотомодификации мембранных белков.

При обсуждении возможных путей реализации повреждающего действия перекисного фотоокисления липидов на биомембраны выдвигают предположение о существовании двух различных механизмов. Один из них заключается, вероятно, в нарушении свойств самой липидной зоны мембраны. В пользу этого свидетельствует тот факт, что возрастание ионной проницаемости наблюдается на искусственных липидных мембранах при протекании в них перекисного фотоокисления липидов. Второй механизм, видимо, связан с разрушением белковых SH-групп, необходимых для сохранения барьерных свойств мембран. Косвенно на это указывают данные о более высоком квантовом выходе разрушения тиолов

мембран (0,18) по сравнению с таковым в случае УФ-облучения тиолов белков в растворе (0,03).

В отличие от мембран животных клеток мембраны растительных клеток по критерию изменения их ионной проницаемости обнаруживают значительно более высокую квантовую чувствительность при действии УФ-излучения. Так, увеличение проницаемости плазматической мембраны растительных клеток для

Таблица XXX.1. Основные фотодеструктивные реакции и типы повреждений в биологических макромолекулах и мембранах, индуцируемые излучением различных областей УФ-спектра

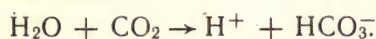
Вид УФ	Биологические структуры			
	ДНК	белки	мембраны	
			животных клеток	растительных клеток
Коротковолновый УФ (< 290 нм)	Фотодимеризация оснований (пиримидиновые димеры) ^{1,2}	Фотолиз триптофановых и цистиновых остатков (радикалы триптофана и цистина, межмолекулярные ковалентные сшивки)	Перекисное фотоокисление липидов (гидроперекиси, ТБК-активные продукты)	Фотоинактивация АТФазы
Длинноволновый УФ (320—400 нм)	Одноцепочечные разрывы	—	Перекисное фотоокисление липидов (гидроперекиси)	—

¹ Реакция фотообратима, димеры мономеризуются фотолизой в процессе фотореактивации (см. § 6 этой главы).

² Выход димеров может быть уменьшен при связывании серотонина с ДНК в процессе фотозащиты (см. § 6 этой главы).

различных ионов (K^+ , Na^+ , Cl^- , HCO_3^-) и ее деполяризация (рис. XXX.7) наблюдаются уже при таких дозах УФ света (254 нм, 500—2000 Дж/м²), которые на порядок ниже доз УФ-излучения, приводящих к изменению барьерных свойств мембран животных клеток.

На культивируемых *in vitro* растительных клетках показано, что УФ-индуцированный выход K^+ во внеклеточную среду идет со скоростью $5 \cdot 10^{-10}$ мкмоль/мин на клетку и сопровождается выходом в среду HCO_3^- , образующегося в ходе реакции гидратации CO_2 :



Это, в свою очередь, вызывает уменьшение цитоплазматического рН, зарегистрированного методом ³¹P-ЯМР.

Природа отмеченных изменений исследована в экспериментах с изолированными плазматическими мембранами. Оказалось, что наиболее чувствительным к УФ-облучению компонентом является АТФаза, связанная с трансмембранным ионным транспортом, причем ее фотоинактивация происходит в результате прямого поглощения квантов УФ-света. В пользу этого свидетельствует тот факт, что чувствительность АТФазы к УФ была одинаковой при облучении как мембран, так и раствора очищенного фермента. На основании снятого спектра действия УФ-инактивации мембранной АТФазы предполагают, что ее хромофором является триптофан (рис. XXX.8).

Изложенные выше данные об основных фотодеструктивных процессах, протекающих в биологических структурах под действием УФ излучения, суммированы в табл. XXX.1.

Заключение

Изложение основ биофизики показывает, что область этой науки, круг изучаемых вопросов, круг объектов исследования чрезвычайно широки. Поэтому полезно попытаться провести некоторую систематизацию, представить в обобщенном виде структуру современной биофизики. В настоящее время можно выделить пять крупных разделов.

Биофизика

Анализ физических механизмов взаимодействий в биологических структурах и их динамики	Проблема организации в биологии. Роль среды в образовании структур. Математическое моделирование сложных систем	Трансформация энергии в биологических процессах, происходящих на различных уровнях организации. Энергетика и управление	Механизмы действия физических факторов на биологические системы на различных уровне их организации	Развитие теоретических и экспериментальных методов исследования. Техника эксперимента
--	---	--	--	---

Практические области использования фундаментальных результатов

Необходимость разносторонней характеристики объектов исследования в значительной мере определяет связь биофизики с другими биологическими науками. Для развития биофизики большое значение в последние десятилетия имеет бурный рост биохимии, биоорганической химии, молекулярной биологии, экологии, биологии клетки; сохраняются и традиционные контакты биофизики с физиологией растений и животных. Таким образом создается основа для выявления связи между молекулярными процессами на различных структурных уровнях живой системы и биологическими функциями.

В целом исследование механизмов взаимодействий на разных уровнях организации биологических систем во многом определяют успехи современной биофизики. Биофизика изучает разнообразные биологические явления, молекулярную основу которых составляют: транспорт ионов, изменения физико-химического состояния биологических мембран, биоэлектrogenез, механохимические процессы, трансформация энергии и перенос электронов, первичные фотобиологические процессы, первичные реакции на действие электромагнитных полей и ионизирующего и оптического излучения.

Анализ широкого спектра этих процессов показывает главное — общность первичных молекулярных механизмов совершенно разных, казалось бы, биологических явлений, протекающих в различных объектах. Например, неразрывная связь электронных свойств макромолекул с их динамической структурой играет определяющую роль в ферментативном катализе. Эта же закономерность присуща и механизмам, например, фотосинтеза и возникновения биопотенциалов при трансмембранном переносе ионов по каналам. Уже отсюда видно, что электронно-конформационные взаимодействия лежат в основе молекулярных механизмов различных по своей биологической роли процессов. Существование общих форм такого рода взаимодействий свидетельствует о единстве функциональной организации живого на молекулярном уровне, что также проявляется

и в регуляции биологических систем. В этой области с позиций синергетики — новой отрасли науки об организации структур вдали от состояния равновесия — объясняются многие свойства биологической организации, в том числе и некоторые явления дифференцировки и морфогенеза. Все большее значение приобретает развитие теории информации в применении к анализу биологических процессов.

Развитие биофизики в наше время определяется главным образом двумя связанными между собой общими направлениями: 1) исследованием физических механизмов, динамики и биологической роли структурных перестроек и 2) изучением механизмов регуляции и самоорганизации в биологических системах. Эти направления включают и разработку структурно-динамических моделей молекулярно-биологических «машин» разного уровня сложности. Необходимым условием успеха здесь является органическое слияние молекулярно-физического и теоретико-системного подходов для понимания общих глубинных механизмов и создания единой картины биологических явлений.

Одно из основных условий проведения фундаментальных и прикладных биофизических работ состоит в совершенствовании современных методов исследования и прежде всего таких, с помощью которых можно было бы получать информацию от неповрежденных живых систем. В настоящее время наиболее перспективно здесь развитие различных методов спектроскопии. Повышение технических возможностей эксперимента предусматривает постоянное увеличение разрешающей способности и чувствительности методов, развитие математических способов обработки данных с помощью ЭВМ и автоматизацию научных исследований.

Наряду с участием в решении фундаментальных вопросов теоретической биологии биофизика решает и задачи чисто прикладного аспекта, а также теоретические проблемы, решение которых имеет уже сегодня непосредственное практическое значение.

Так, медицина использует методы биофизики в диагностике, профилактике и лечении, а также в целях скрининга при отборе и оценке лекарственных веществ. В сельском хозяйстве широко применяют биофизические экспресс-методы для характеристики сельскохозяйственных растений при отборе соле-, морозо- и теплоустойчивых сортов, при закалке растений, при дезинфекции посевного материала. В пищевой промышленности с помощью физических воздействий производят обработку продуктов питания для продления сроков хранения и сохранения вкусовых и питательных качеств. В спорте выработка динамических тестов для определения функционального состояния спортсменов, отработка оптимальных режимов тренировок и исследование изменений в организме при экстремальных нагрузках требуют применения биофизических методов. При решении вопросов, касающихся охраны окружающей среды, также используются экспресс-методы для оценки состояния биологических объектов.

Важнейшее значение имеет исследование механизмов действия физических факторов на живые объекты. При этом крайне существенно научиться различать меру воздействий, вызывающих нормальную адаптационную реакцию, и воздействий, ведущих к необратимым последствиям.

Наконец, большие перспективы имеет новая пограничная область науки и техники — биомикроэлектроника, в которой используются биомакромолекулярные комплексы для разработки технических устройств высокоэффективного преобразования одного вида энергии в другой.

Итак, рассмотренные в учебнике основные направления и пути развития биофизики показывают, что биофизика — фундаментальная современная наука, успешно решающая кардинальные теоретические и прикладные проблемы биологии и вносящая существенный вклад в научно-технический прогресс.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

К разделу VI

- Антонов В. Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. М., 1982.
Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.
Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран. М., 1982.
Болдырев А. А. Введение в биохимию мембран. М., 1986.

К разделу VII

- Биофизика мембран. Т. 2. Ионные каналы и их модели. М., 1982.
Иваницкий Г. Р., Кринский В. И., Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки. М., 1978.
Кольс О. Р., Максимов Г. В. Ритмическое возбуждение в соматических нервах: физико-химические аспекты. М., 1987.
Костюк П. Г. Кальций и клеточная возбудимость. М., 1986.
Костюк П. Г., Крысталь О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. М., 1981.
Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М., 1980.
Маркин В. С., Пастушенко В. Ф., Чизмаджев Ю. А. Теория возбудимых сред. М., 1981.
Маркин В. С., Чизмаджев Ю. А. Индуцированный ионный транспорт. М., 1974.
Мембраны: ионные каналы // Сб. статей; Под ред. Ю. А. Чизмаджева. М., 1981.
Общая физиология нервной системы: Руководство по физиологии. Л., 1979.
Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. Мембранно-активные комплексы. М., 1974.
Трошин А. С. Распределение веществ между клеткой и средой. Л., 1985.
Ходжкин А. Нервный импульс. М., 1965.
Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран. М., 1975.

К разделу VIII

- Бэгшоу К. Мышечное сокращение. М., 1985.
Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. М., 1977.
Букатина А. Е., Морозов В. Н., Шноль С. Э. Движение немышечных клеток и их компонентов. Л., 1977.
Волькенштейн М. В. Общая биофизика. М., 1978.
Дежеревский В. И. Математические модели мышечного сокращения. М., 1977.
Кучеренко Н. Е., Войццкий В. М. Биоэнергетика. Киев, 1982.
Ленинджер А. Основы биохимии. М., 1985. Т. 1—3.
Лоув А. Биохимическая термодинамика. М., 1982.
Никольсон П. Биоэнергетика. М., 1984.
Рекер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды. М., 1979.
Рубин А. Б., Шинкарев В. П. Транспорт электронов в биологических системах. М., 1984.
Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. М., 1983.
Хилл А. Механика мышечного сокращения. М., 1985.

К разделу IX

- Биофизика фотосинтеза / Под ред. А. Б. Рубина. М., 1975.
Говинджи А. Фотосинтез. М., 1987. Кн. I и II.
Клейтон Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М., 1984.

Хит О. Фотосинтез. М., 1972.

Холл Д., Рао К. Фотосинтез. М., 1983.

Фотосинтез и использование энергии солнечной радиации/Под ред. А. А. Ничипоревича. Л., 1975.

К разделу X

Балашов С. П., Литвин Ф. Ф. Фотохимические превращения бактериородопсина. М., 1985.

Волотовский И. Д., Конев С. В. Структурная динамика фоторецепторного аппарата. Минск, 1986.

Смит К., Хэнеуолт Ф. Молекулярная фотобиология. М., 1972.

Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения/Под ред. А. Б. Рубина. М., 1987.

Предметный указатель¹

Автоколебания в мембранах 137
Аденилатциклаза 181
— Ca^{2+} -зависимая активация 132
Акридиновые красители, защитное действие 279
Актин 165, 166*
Акцепторы электрона в РЦ ФС I 216
Аламетицин 93, 94*
Антиоксиданты 44
Антипорт 54, 154
АТФ, синтез 158, 159
АТФаза, УФ-инактивация 290*, 291
 H^+ -АТФаза 110
— ингибиторы 156
— энергизация 156
 Na^+ , K^+ -АТФаза 102, 103*, 105*
АТФазный комплекс (H^+ -АТФаза) 155
АТФ-синтетаза (H^+ -АТФаза) 146, 148*, 158, 159
Ауксин 276
Ацетилхолин, фотомиметические свойства 273, 274*

Белки интегральные 7
— мембранные 7
— периферические 7
N-Белок регуляторный 181
Белок-белковые взаимодействия 42
Бислой, разрушение 25
Бислойные мембраны 12, 13*, 14*, 15*
Бактериоопсин 250, 253
Бактериородопсин (Бр) 248, 249*
— адаптация световая 250, 253
— — темновая 250, 252
— батоформа 254, 263
— модельные системы 253, 254*
— молекулярный механизм регуляции фото-превращений 255
— промежуточные состояния 251, 252*
— протонная помпа 251, 252
— роль белка 253
— структура 249, 250
— фотоцикл 251, 252*
— — активация 253
— — ключевой продукт (M_{412}) 255
— — первичный акт 256
— — — природа 256
— — — смещение протона 257
— — — энергетическая схема 259

— — перенос протона 251
— электроиндуцированные изменения поглощения 255
Бактериофеофитин (Бфф) 209
Бактериохлорофилл (Бхл) 209, 210*

Валиномицин 89, 90*, 91*
Везикулы 12, 13
Возбудимость, модель Ходжкина — Хаксли 124
Возбуждение электрическое в мембране, модель Ходжкина — Хаксли 136
— математические модели 136
Вольт-амперная (ые) характеристика (и) канала 79
— — мгновенные 120
«Ворота» активационные 125
— инактивационные 125
— токи ворот 125, 126*
Воротные заряды, иммобилизация 127
Вязкость 21

Гидратация ионов 56, 57
Гидрофобные взаимодействия в мембранах 17*
Гипотеза хемиосмотическая Митчела 146
Гистерезис 36, 143
Голохром — протохлорофиллид, светочувствительная система 274
Гош-конформация 30, 31*
Грамицидин А 92, 93*, 130

Давление расклинивающее 14, 15, 18, 19, 26
Двойной слой электрический 65
Деполаризация скачкообразная 138
— устойчивая 137
Дефекты мембраны локальные 27, 28*
Дзета-потенциал 67
Дипольная модель регуляции проводимости 128, 129*
Диурон 193, 203, 219
Диффузия 50
— латеральная 20, 21*, 22*
— облегченная 52
— одномерная 50, 51*
— простая 53
— свободная 57*
Диффузный слой 65
N, N'-Дициклогексилкарбодимид (ДЦКД) 155, 156

¹ Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки или таблицы.

Длина экранирования (дебаевская длина) 63
 Длительность флуоресценции пигментных форм 202, 203*
 ДНК, сшивки с белками 280
 — фотоионизация при лазерном облучении 282
 — фотохимические реакции 277
 — хромофоры 277
 Донор (первичный) электрона в РЦ ФС I (P_{700}) 216, 217*
 — — — — — ФС II (P_{680}) 218

Железосерные белки 194, 202, 226
 Жидкая пленка 9, 10*
 Жидкие кристаллы 9
 Жирные кислоты 6
 Ca^{2+} -Зависимая АТФаза 105
 Закон Больцмана 65
 — Стокса 57
 — Фика первый 50
 — — второй 50, 182
 Запахи первичные 184

Изородопсин 261
 Импеданс 100
 Ионифоры 88, 90*
 Ионы потенциалопределяющие 67

Кабельные свойства аксона 139, 140*
 Кальмодулин 132
 H^+ -Каналы 110, 111
 K^+ -Канал 77, 85, 86* 87, 120, 124*
 Na^+ -Канал 77, 85, 86*, 87, 120, 124
 Канал(ы), блокировка 80
 — время жизни 97
 — «двухместный» 81
 — дипольная модель 128, 129*
 — ионные 77
 — — нервных волокон 85, 86*
 — кулоновские взаимодействия 83
 — насыщение 88
 — образованные аламетицином 93, 94*
 — — грамицидином А 92, 93*
 — «одноместный» 81
 — проводимость 82, 97
 — протонный редокс-зависимый 152
 — селективность 84
 — функции состояния 82
 Каналообразующие соединения 91
 Кинк 30, 31*
 Кислород синглетный 216
 Кислородвыделяющий комплекс (КВК) 218, 221
 Комплекс регуляторный Ca^{2+} -чувствительный 165
 Константа Гамакера 18, 19
 Конформационная динамика в РЦ 232
 Кооперативность, параметр 36
 — единица 36
 Коэффициент проницаемости 73
 — распределения межфазный 60

Лиганд-рецепторный комплекс 177
 Липид-белковые взаимодействия 40, 41
 Липид-липидные взаимодействия 40
 Липиды аннулярные 41

— гидратация 17
 — мезофазы (мезоморфные состояния) 11
 — мембранные 6, 7*, 9
 — полиморфизм лиотропный 10, 11*
 — — термотропный 10, 11*
 Липосомы моноламеллярные 12, 13*
 — мультиламеллярные 12, 13*

Межмолекулярные взаимодействия мембран 18, 39

Мембранный генератор тока, модель 144

Мембраны возбудимые 136

— искусственные лецитиновые 256
 — конформационные свойства 30
 — механические свойства 20
 — подвижность молекулярных компонентов 20

— преобразование энергии 146

— структура 5, 8*, 9

— «сухие» 25

— тилакоидные 199

— упругие свойства 23, 24, 25*

— фазовые переходы 30, 34, 37

Метародопсин II 262, 263

3-Метилкоксиндол 276

Метод(ы) импульсной лазерной спектроскопии 256

— — пикосекундной спектродиффузиометрии 202

— резонансной спектроскопии комбинационного рассеяния 252, 257, 263

— флеш-фотолиза 272, 286, 288

Миграция энергии возбуждения 196

— — — в ПБК I и ПБК II 196, 198*

— — — — ССПБК 196, 198*, 206, 207*

— — — — ФС I и ФС II 204, 205*

— — — в фотосинтетической мембране 220

— — — — модель мультицентральной 193

— — — — — уницентральной 193

— — индуктивный резонанс 206

— — экситонный механизм 208

Микровязкость 22

— в хроматофорах 239

Миозин 165, 167

Миозиновый мостик 166*—168

— — модель 173

Миофибриллы 165

Мода акцентирующая 227—229, 232

— мягкая 229

Модель возбуждения Теорелла См. Осциллятор мембранный

— Дешеревского 169

Модуль поверхностного изотермического сжатия [модуль Юнга] 23, 24

Молекулы «сигнальные» 176

Монослой 9, 10*

Мышца поперечно-полосатая, свойства 163

— принцип работы механохимического преобразователя 175

— энергопродукция 164

Ca^{2+} -Насос 105

H^+ -Насос 102, 109, 112

Na^+ , K^+ -Насос 102, 103*, 106, 116

Насос, проводимость 109

- Натяжение изотропное 23
 — межфазное 20
 — пленки полное 20
- Нервный импульс 113, 124
 — — генерация 114, 176
 — — коллективный 144
 — — неустойчивый 141*, 142
 — — проведение 115*, 116, 118
 — — распространение 139—141
 — — — скорость 142, 143*
 — — устойчивый 141*, 142
- Обоняние, квантовая теория 184
 — стереохимическая концепция 184, 185*
- 5-Оситриптамиин 283
- Олигомицин 155
- Опсин 248, 250*
- Осциллятор мембранный 133
- Параметр порядка молекулярный 32, 33*, 37, 38
- Перекисное окисление липидов 42, 45
- Переносчики подвижные 88, 89*, 152
- Перколяционный порог 183
- Перколяция, теория 183
- Пигмент-белковый комплекс (ПБК) 201, 248
 — — ФС I (ПБК I) 194
 — — — II (ПБК II) 194
- Z-Пластины 163
- Пластохинон (Пх) 150*, 153, 193, 194, 199, 202, 219, 224
 — первичный 220
- Пластоцианин (Пц) 194
- Пленки толстые 19
 — тонкие 18, 19
 — цветные 15
 — черные *См.* Бислойные мембраны
- Поверхностная активность 16
- Подвижность ионов 71
- Полупора 92
- Пора водная 91
 — инвертированная 26
 — теория (молекулярного сита) 84
 — сквозная 26
- Потенциал(ы) безразмерный 78
 — граничные 95
 — действия 113, 136
 — дипольный 95
 — диффузионный 72
 — межфазная разность 61
 — межфазный скачок 60, 64
 — мембранный 74, 108, 109, 115
 — метод фиксации 116, 117*, 134
 — оседания 67
 — поверхностный 66, 95
 — покоя 114
 — течения 67
 — химический стандартный 55, 56
 — электрический 58, 59*, 63, 65
 — — зрительной клетки 267
 — — поверхностный 252
 — электрокинетический 67
 — электрохимический 55, 56, 59
 — — градиент 154
- Приближение Дебая (модель Гуи) 62
 — постоянного поля 73
- Пробой мембраны электрический 26
- Проводимость ионная 74
 — кальциевая 131
 — — мембраны 115, 120
 — натриевая 121*, 267
 — флуктуации 97
- Проназа 119*, 120
- Проницаемость ионная 74
- Протеолипосомы 13
- Протон, механизм переноса 156
 — — трансдукции 151
 — — перенос в фотосинтетической мембране 153
- Протонофор 90, 91*
- Пурпурные мембраны (ПМ) 248
- Равновесие Доннана 68
 — ионное 58
- Реакционные центры (РЦ) закрытые 202, 204
 — — компоненты 209
 — — открытые 202
 — — пурпурных фотосинтезирующих бактерий 209
 — — фотосинтетические 202
 — — ФС I зеленых растений 216, 217*
 — — ФС II зеленых растений 218, 220*
- Реакция(и) двухквантовые 280
 — — ДНК 281
 — фотодинамическая 284
 — цепные 43
- Редокс-петля 152
- Редокс-помпа 107
- Ретиналь 248, 250*
 — изомеризация 250—252, 257, 258, 260, 261*, 265
 — — угнетение 253
- Рецепция вкусовая 185
 — гармональная 181
 — закономерности 176
 — обонятельная 184, 185*
 — переработка сигнальной информации 176
- Родопсин 248, 260, 274
 — спектральные свойства 261
 — фотолиз 261, 262*
 — фотореактивация 262*, 263
 — фоторецепторная мембрана 260
 — фотоцикл, первичный акт 263
 — цис-транс-фотоизомеризация 263
- Саркомер(ы) 163, 166*
 — сокращение 165, 167*
 — структура 165
- Светособирающий пигмент-белковый комплекс (ССПБК) 194, 196
 — — — фосфорилирование 199
- Селективность ионная, ряды 85, 86*
 — ионообменная 84
- Селективный фильтр 125
- Семихиноны 224
- Серотонин 284
- Симпорт 53, 154
- Синглетное состояние 189
- Синглетный кислород 44
 — — тушение физическое 44
 — — — химическое 45
- Сократительные системы 161
- Сокращение мышечное, механохимия 169

- — замкнутого состояния 171
- — моделирование 168
- Соотношение Уссинга 76, 87
- Уссинга — Теорелла 76
- Сопряжение энергетическое, механизмы 157
- Спазмонема 161, 162
- Спилловер 198, 208
- Спин-спиновый обмен 213
- Спонтанная электрическая активность 138
- Супероксидный радикал 43
- Z-Схема 192*, 193
- Скользющие нити, схема Хаксли 166

- Теорема Найквиста 99
- Термодинамика устойчивости мембран 16, 19
- Термолюминесценция 224
- Тетраэтиламмоний (ТЭА) 119*, 120, 120, 126, 131
- Тетродотоксин (ТТХ) 119*, 120, 126, 131
- Ток(и) емкостной 118
- ионный 119
- смещения асимметричный 126—128
- α -Токоферол 270, 289
- Транс-гош-конформация 31
- Транспорт активный 54, 102
- — кальция 105
- — натрия 107*
- вторично-активный 54
- индуцированный 88
- ионов в возбудимых мембранах 113
- — — каналах 77
- — — открытым канале 84
- — — сплошной (гомогенной) среде 77
- — электрогенный 106—108*
- неэлектролитов 50
- пассивный 52, 55
- первично-активный 54
- протонов 109, 111, 112*
- Триггерные свойства мембран 135, 138
- Триплетное состояние 189, 190
- Триптофан, механизм образования катион-радикала 287
- фотоиндукция 286
- фотолиз 286
- Тропомозин 165
- Тропонин 165
- Туннелирование электрона в РЦ 227
- — изотопный эффект 228, 229*
- — независимость от температуры 229, 230*
- — роль контактных состояний 229
- — структурное 230
- — температурная зависимость 227

- Убаин 102
- Убихинон 148*, 149, 209
- Ультрафиолетовый свет, действие на белки 285
- — — биологические мембраны 289
- — — длинноволновый, действие на ДНК 284
- — — коротковолновый, деструктивное действие 277
- Уравнение(я) Больцмана 127
- Борна 57, 60, 88, 89*, 111
- Гендерсона 72
- Гиббса адсорбционное 16
- Гольдмана 64, 108, 114

- — для мембранного потенциала 74, 75*
- — — потока ионов 73
- Гуи—Чэпмена 66
- непрерывности 50
- Нернста 58, 88, 114, 240
- Нернста—Планка 50, 71
- переноса феноменологические 68
- Пуассона 62, 66, 72
- Скэтчарда 179
- Смолуховского 67
- Стокса—Эйнштейна 21, 51, 56, 57*
- Хилла 163, 169, 170
- Ходжкина—Хаксли полное 136

- Фазовые переходы, модели 37, 38
- o-Фенантролин 222, 225
- Феофитин 220
- Ферредоксин 194, 216
- Фитохром 271
- фотоконверсии 272
- фотохимическая реакция первичная 272
- Флеш-фотолиз адсорбционный 264
- Фликкер-шум 101
- Флип-флоп переход (трансмембранное движение) 21
- Флуоресценция замедленная (рекомбинационная), механизмы 208, 221, 222
- кинетика затухания 202
- — — в РЦ 213
- тушители 200
- Фосфоинозитол 268
- Фотобиологические процессы 188, 189
- — первичные 268
- Фотогидратация 279
- Фотодеструкция 270
- Фотодимеризация 277
- Фотозащита ДНК 283
- Фотоинактивация белков 288
- Фотолиаза 283
- Фотолиз липидов 289
- ретинала, модели 265
- «Фотоотбеливание» 182
- Фотопродукты летальные 285
- Фотореактивация 283
- Фоторегуляция 271
- Фоторецепция, «кальцевая» гипотеза 268
- Фотосенсибилизация молекулярная 285
- Фотосинтез, ингибиторы 193
- первичные процессы 187, 191, 192*, 227
- — — математические модели 239—242
- Z—схема 192*, 200
- Фотосинтетическая единица (ФСЕ) 193, 196, 200, 269
- Фотосистемы I и II (ФС I, ФС II) 150, 192, 195, 220
- Фототрансдукция 267
- Фототропизм 276
- Фототропический эффект 276
- Функция автокорреляционная 98

- Хемилюминесценция 46—48
- активаторы 47
- Хинон(ы) 196, 202
- вторичный 212, 224, 225*
- латеральная диффузия 239
- первичный 211, 224

- Хинонные акцепторы, контактные состояния 237
 Хинонный акцепторный комплекс 224
 Хлорофилл *a* 194
 Хромопротеин, электронно-конформационные взаимодействия 269
 Хромофоры флавиновые 276
- Центры железосерные в РЦ ФС I 216
 Q-Цикл 149
 Циклические нуклеотиды 181
 Цистин, фотолиз 286
 Цитохром(ы) *a* 151*, 152
 — *b* 149, 150*
 — *c* 147, 149, 150*
 — Р-450 43
 Цитохромный комплекс *b₆*—*f* 194
- h*—Частицы 123, 136
m—Частицы 123, 127, 136
n—Частицы 122, 136
 Частицы воротные 125
- Шиффово основание 249—252*, 261
 Шум(ы) белый 100
 — дробовой 101
 — открывания-закрывания каналов 98
 — тепловой 99
 — транспортный 101
 — энергетический спектр 99
 — $1/f$ 101
- Экворин 131
 Эксиплекс 191
 Электрогенный насос, модель 108, 109*
 Электродиффузионная теория транспорта ионов 71
 Электрокинетические явления 67
 Электрон, вероятностная модель переноса в РЦ 215
 — перенос безактивационный 237
 — — в РЦ 210*, 212
 — — — влияние температуры 233
 — — — — параметры подвижности 234
 — — — — пурпурных бактерий 215
 — — — системе хинонных акцепторов 233*, 236
 — — туннельный между *P** и Бфф 214
 — — уравнения 239
 Электронно-транспортные цепи (ЭТЦ) 146—148*, 150*, 191
 Электронные уровни (состояния) 189, 190*
 Электроосмос 67
 Электроольфактограмма 185
 Электрострикция 24
 Электрофорез 67
 Энергетический профиль (барьеры) каналов 78—82*
 Энергия возбуждения, захват в РЦ 200
 — — пути трансформации 189
 — иона в мембране 61
 — механохимические преобразователи 161
 Энергопродукция мышцы 171
 Эффект Мессбауэра, вероятность 234*, 235
 — Фенна 163
 — Эмерсона 198

Оглавление

Предисловие	3
 Часть третья Биофизика мембранных процессов	
Раздел VI. Структурно-функциональная организация биологических мембран	5
Глава XV. Молекулярная организация биологических мембран	6
§ 1. Состав и строение биологических структур	6
§ 2. Образование мембранных структур	9
Монослон. Жидкие кристаллы	9
Искусственные бислойные мембраны	12
§ 3. Термодинамика процессов формирования и устойчивости мембран	16
§ 4. Механические свойства мембран	20
Глава XVI. Конформационные свойства мембран	30
§ 1. Фазовые переходы в мембранных системах	30
§ 2. Теории фазового перехода	37
§ 3. Особенности межмолекулярных взаимодействий в мембранах	39
§ 4. Свободнорадикальное перекисное окисление липидов мембран	42
Раздел VII. Транспорт веществ и биоэлектрогенез	49
Глава XVII. Транспорт неэлектролитов	50
§ 1. Диффузия	50
§ 2. Облегченная диффузия	52
Глава XVIII. Транспорт ионов. Ионные равновесия	55
§ 1. Электрохимический потенциал	55
§ 2. Гидратация ионов	56
§ 3. Ионное равновесие на границе раздела фаз	58
§ 4. Профили потенциала и концентраций у границы раздела фаз	61
§ 5. Двойной электрический слой	65
§ 6. Доннановское равновесие	68
Глава XIX. Электродиффузионная теория транспорта ионов через мембраны	71
§ 1. Уравнение электродиффузии Нернста — Планка	71
§ 2. Приближение постоянного поля	73
Глава XX. Ионный транспорт в каналах	77
§ 1. Дискретное описание транспорта	77
§ 2. Блокировка и насыщение канала	80
§ 3. Функции состояния канала	82
§ 4. Ионный канал как динамическая структура	83
§ 5. Транспорт в открытом канале. Теория селективности	84
§ 6. Ионные каналы нервных волокон	85

Глава XXI. Индуцированный ионный транспорт	88
§ 1. Бислойные липидные мембраны	88
§ 2. Подвижные переносчики	88
§ 3. Каналообразующие агенты	91
§ 4. Влияние поверхностного и дипольного потенциалов на скорость ионного транспорта	95
§ 5. Флуктуации проводимости мембран	97
Глава XXII. Активный транспорт	102
§ 1. Натрий-калиевый насос	102
§ 2. Активный транспорт кальция	105
§ 3. Электрогенный транспорт ионов	106
§ 4. Транспорт протонов	109
Глава XXIII. Транспорт ионов в возбудимых мембранах	113
§ 1. Потенциал действия	113
§ 2. Ионные токи в мембране аксона	116
§ 3. Описание ионных токов в модели Ходжкина — Хаксли	121
§ 4. Токи ворот	125
§ 5. Дипольная модель канала	128
§ 6. Кальциевая проводимость электровозбудимых мембран	131
§ 7. Физико-химические модели возбуждения. Осциллятор Теорелла	133
§ 8. Математические модели возбудимых мембран	136
§ 9. Распространение импульса	139
Раздел VIII. Трансформация энергии в биомембранах	145
Глава XXIV. Перенос электронов и трансформация энергии в биомембранах	146
§ 1. Общая характеристика преобразования энергии в биомембранах	146
§ 2. Электронно-транспортные цепи	146
§ 3. Механизмы транслокации протонов и генерации $\Delta\mu\text{H}^+$ в дыхательной и фотосинтетической цепях электронного транспорта	154
§ 4. АТФазный комплекс	155
§ 5. Механизмы энергетического сопряжения	157
Глава XXV. Биофизика сократительных систем	161
§ 1. Общая характеристика механохимических процессов	161
§ 2. Основные свойства поперечно-полосатой мышцы как механохимического преобразователя энергии	163
§ 3. Структуры саркомера и их изменения при сокращении	165
§ 4. Моделирование мышечного сокращения	168
Глава XXVI. Биофизика процессов рецепции	176
§ 1. Общие закономерности рецепции	176
§ 2. Особенности гармональной рецепции	181
§ 3. Особенности обонятельной и вкусовой рецепции	184

Часть четвертая

Биофизика фотобиологических процессов

Раздел IX. Первичные процессы фотосинтеза	187
Глава XXVII. Трансформация энергии в первичных процессах фотосинтеза	189
§ 1. Общая характеристика начальных стадий фотобиологических процессов	189
§ 2. Общая схема первичных процессов фотосинтеза	191
§ 3. Миграция энергии и строение фотосинтетического пигментного аппарата	196
§ 4. Механизмы миграции энергии в фотосинтетической мембране	200
§ 5. Реакционные центры пурпурных фотосинтезирующих бактерий	209
§ 6. Реакционные центры фотосистемы I зеленых растений	216
§ 7. Реакционные центры фотосистемы II зеленых растений	218
§ 8. Механизмы замедленной флуоресценции	221
§ 9. Хинонный акцепторный комплекс	224

<i>Глава XXVIII. Электронно-конформационные взаимодействия в первичных процессах фотосинтеза</i>	227
§ 1. Температурная зависимость переноса электрона в реакционных центрах	227
§ 2. Конформационная динамика и перенос электрона в реакционных центрах	232
§ 3. Перенос электронов и формирование контактных состояний в системе хинонных акцепторов ($PQ_A Q_B$)	236
§ 4. Математические модели первичных процессов переноса электрона в фотосинтезе	239
§ 5. Вероятностная модель переноса электрона в многокомпонентном реакционном центре	245
Раздел X. Первичные фотопроцессы в биологических системах	247
<i>Глава XXIX. Фотопревращения бактериородопсина и родопсина</i>	248
§ 1. Структура и функции пурпурных мембран	248
§ 2. Фотоцикл бактериородопсина	251
§ 3. Модельные системы, содержащие бактериородопсин	253
§ 4. Первичный акт фотопревращений бактериородопсина	256
§ 5. Структура и функции зрительного пигмента родопсина	260
§ 6. Первичный акт фотопревращения родопсина	263
§ 7. Проблема внутриклеточного «посредника» в механизме фоторецепции	267
§ 8. Сравнительная характеристика первичных фотобиологических процессов	268
<i>Глава XXX. Фоторегуляторные и фотодеструктивные процессы</i>	271
§ 1. Механизмы фоторегуляторных реакций фитохрома	271
§ 2. Другие фоторегуляторные реакции	275
§ 3. Особенности фотодеструктивного действия ультрафиолетового света	276
§ 4. Фотохимические превращения ДНК	277
§ 5. Двухквантовые реакции	280
§ 6. Фотореактивация и фотозащита	283
§ 7. Действие длинноволнового ультрафиолетового света	284
§ 8. Действие ультрафиолетового света на белки	285
§ 9. Действие ультрафиолетового света на биологические мембраны	289
<i>Заключение</i>	292
<i>Рекомендуемая литература</i>	294
<i>Предметный указатель</i>	296

Учебное издание

Андрей Борисович Рубин

БИОФИЗИКА. В 2 кн.

Кн. 2. Биофизика клеточных процессов

Заведующий редакцией А. Г. Гаврилов

Научный редактор О. Р. Кольс

Редактор А. С. Орлова

Младшие редакторы И. М. Павлова, Е. И. Попова

Художественный редактор Т. А. Коленкова

Художник Ю. Д. Федичкин

Технический редактор Л. А. Муравьева

Корректор Г. И. Кострикова

ИБ № 6443

Изд. № Е-512. Сдано в набор 30.12.86. Подп. в печать 27.07.87.
Т-15643. Формат 70×100/16. Бум. офсетная № 2. Гарнитура
Литературная. Печать офсетная. Объем 24,7 усл. печ. л.+0,33
усл. печ. л. форзац. 50,05 усл. кр.-отт. 23,82 уч.-изд. л.+0,46
уч.-изд. л. форзац. Тираж 25 000 экз. Зак. 2322. Цена 1 р. 30 к.

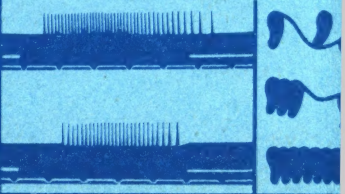
Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4,
Неглинная ул., д. 29/14.

Московская типография № 4 «Союзполиграфпрома»
при Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли.
129041, Москва, Б. Переяславская ул., 46

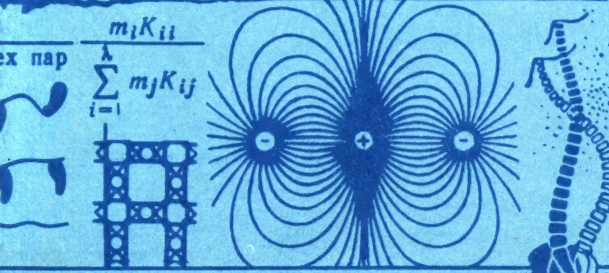
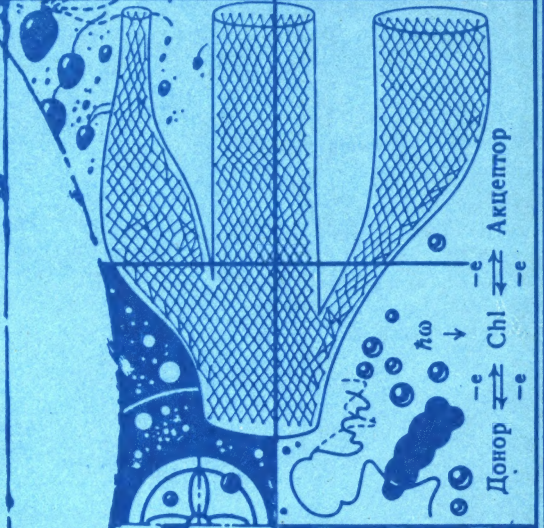
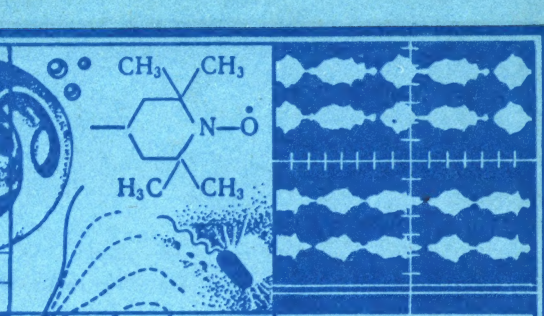
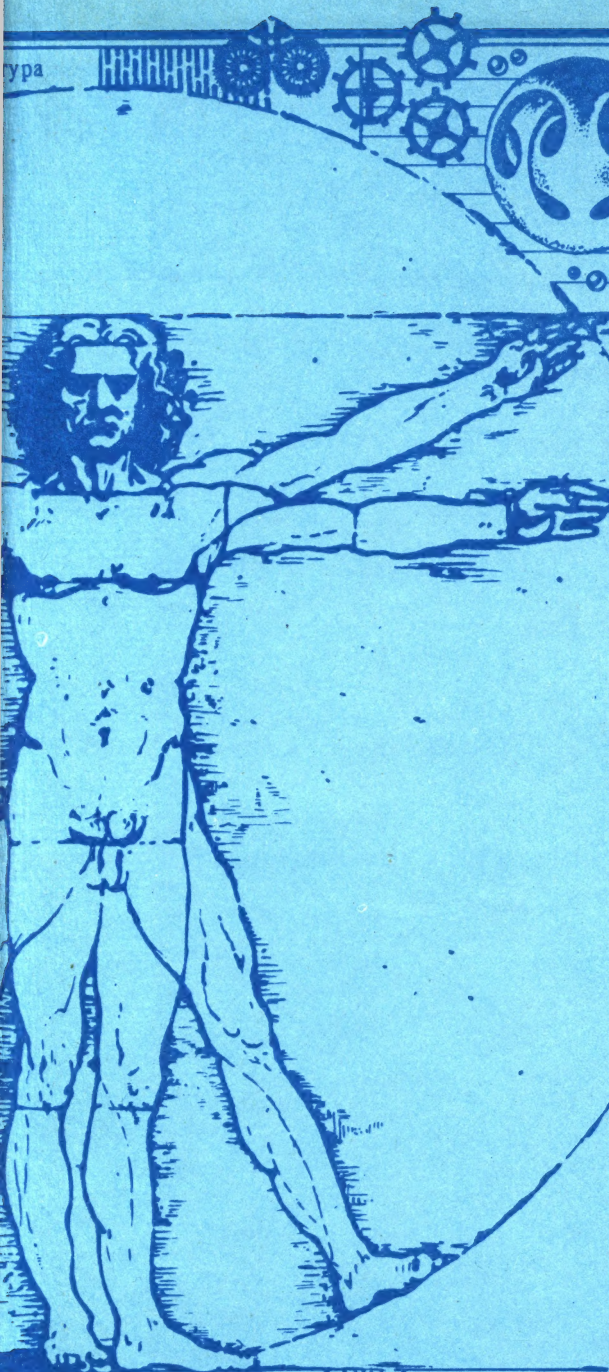
Неравновесие → Диссипация → Неустойчивость и новая с

Возрастание
диссипации

0123456789

$$q_i = \frac{\text{Вероятность пар}}{\text{Сумма вероятностей д}}$$


ура



22

Ar. B. Pyörrä

FINLAND
OF THE
NATIONAL
FINLAND